

Aus dem Institut für Experimentelle Tumorforschung
(Direktorin: Prof. Susanne Sebens)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Expression der Todesrezeptorsysteme TRAIL-R1/-R2/-R4, CD95 und TNF-
R1 und ihrer Liganden im duktalem Adenokarzinom des Pankreas**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
FRIEDERIKE GÄRTNER
aus Frankfurt/Oder

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Kalthoff, Institut für Experimentelle
Tumorforschung

2. Berichterstatter: PD Dr. Christine Halske, Institut für Pathologie

Tag der mündlichen Prüfung: 3.3.2020

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 2.12.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Pankreaskarzinom.....	1
1.2. Tumorrezeptor-vermittelte Apoptose.....	2
1.3 Tumornekrosefaktor α	4
1.4 CD95-Ligand.....	5
1.5 TRAIL.....	6
1.6 Ursachen der Apoptoseresistenz im TRAIL-vermittelten Signalweg.....	8
1.7 Ziel der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Zubehör.....	11
2.1.2 Rezepte der Pufferlösungen für IHC.....	11
2.1.3 Antikörper.....	12
2.1.4 Gewebeproben.....	12
2.1.5 Gewebeschnitte.....	13
2.2 Methoden.....	13
2.2.1 Immunhistochemie.....	13
2.2.2 Antikörperetablierung.....	13
2.2.3 Schnittvorbehandlung.....	14
2.2.4 Primärantikörper.....	15
2.2.5 Basisprotokoll für IHC-Färbungen.....	16
2.2.6 Übersichtstabelle Färbeprotokolle.....	18
2.2.7 Einfluss des Schnittalters auf das Farbergebnis.....	19
2.2.8 Mikroskopische Auswertung.....	19
2.2.9 Statistische Auswertung.....	20
2.2.10 Koexpression der untersuchten Rezeptoren und Liganden.....	21
3 Ergebnisse.....	23
3.1 Das Alter der histologischen Schnitte beeinflusst das Farbergebnis.....	23
3.2 TRAIL-Rezeptor 1.....	24
3.3 TRAIL-Rezeptor 2.....	26
3.4 TRAIL-Rezeptor 4.....	27
3.5 HMGA2.....	29
3.6 Ligand TRAIL.....	31
3.7 CD95.....	33
3.8 TNF-Rezeptor 1.....	36
3.9 TNF-Ligand.....	39
3.10 Koexpression von Rezeptor und Ligand im dukalen Pankreasadenokarzinom.....	41
4 Diskussion.....	50

4.1 Das Pankreaskarzinom	50
4.2 TRAIL-Rezeptoren	50
4.2.1 Subzelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren	52
4.3 Ligand TRAIL	52
4.4 HMGA2	53
4.5 CD95	54
4.6 TNF-Rezeptor 1	55
4.7 TNF-Ligand	57
4.8 Koexpression der untersuchten Rezeptoren und Liganden	59
4.8.1 Korrelation mit den Daten tumorbefallener Lymphknoten.....	60
 5 Zusammenfassung	 62
6 Literaturverzeichnis	64
7 Anhang	76
Repräsentative Beispiele immunhistochemischer Färbungen.....	76
Etablierungsversuche des TRAIL-R3-Ak	78
Korrelation mit den Positivraten tumorbefallener Lymphknoten	82
Danksagung.....	83
Erklärung.....	84
Ethikvotum	85

I Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis inducing factor
APO-1	Apoptosis antigen 1
BCL-2	B-cell lymphoma-2
BCL-XL	B-cell lymphoma-XL
BID	BH3-interacting domain death agonist
CD95	Cluster of differentiation 95
cFLIP	Cellular Fllice-like inhibitory protein
COX	Cyclooxygenase
DAB	Diaminobenzidin
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DR	Death receptor
DISC	Death-inducing signaling complex
DR	Death receptor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
FADD	Fas-associated protein with death domain
GPI	glycosyl-phosphatidyl-inositol
HMGA2	High-mobility-group A2
c-IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-1	Interleukin 1
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein Kinase
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NF-κB	Nuclear factor kappa B
OPG	Osteoprotegerin
PanIN	Pancreatic Intraepithelial Neoplasia
PDAC	Pancreatic ductal adenocarcinoma
RANKL	Receptor activator of NF-κB ligand
RIP1	Receptor interacting protein 1
SMAC	second mitochondria-derived activator of caspase
Tab.	Tabelle
TACE	TNFα-converting enzyme
tBID	truncated Bid

TBS	Tris-buffered Saline
TMA	Tissue micro array
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNFR1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1
TRADD	TNF-Receptor-Associated Death Domain
TRAF2	TNF-Receptor-Associated Factor 2
TRAIL	Tumor-necrosis-factor-related-apoptosis-inducing-ligand
TRAIL-R	TRAIL-Rezeptor
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom stellt aufgrund seiner schlechten Prognose eine der bösartigsten Tumorerkrankungen dar. Unter allen malignen Tumoren weist das Pankreaskarzinom die niedrigste 5-Jahres-Überlebensrate auf (GEKID 2012).

Es kann in 2 Typen unterteilt werden. Das mit 95% am häufigsten auftretende Adenokarzinom (PDAC) entsteht aus dem exokrinen Teil des Pankreas. Aktuell ist davon auszugehen, dass es aus prämaligen Vorstufen des Pankreasgangepithels hervorgeht, bezeichnet als Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) (Oda et al. 2014). Deutlich seltener sind die endokrinen Tumore, welche ihren Ursprung in den Zellen der Langerhans-Inseln haben (Han et al. 2013). Den Großteil dieser seltenen Neoplasien machen Insulinome aus, die sich zu über 80% benigne verhalten. Im Gegensatz dazu sind Gastrinome, VIPome, Glukagonome und hormonell inaktive Tumore des Pankreas zumeist maligne (Schott et al. 2011).

Die höchste Inzidenz des Pankreasadenokarzinoms findet sich in Westeuropa und industrialisierten Ländern. Etwa 15.000 Menschen erkranken jährlich in Deutschland. Bezüglich der Neuerkrankungsrate waren im Jahre 2008 Männer (18,4/100.000 Einwohner, 9. Platz in der Statistik) und Frauen (18,1/100.000 Einwohner, 7. Platz in der Statistik) ähnlich stark betroffen. Im Hinblick auf die Mortalitätsrate rangiert das Pankreaskarzinom aufgrund seiner schlechten Prognose jedoch an 4. Stelle der Krebstodesursachen (Männer: 6,3 %, Frauen 7,5 %) (GEKID 2012). Laut einer Veröffentlichung der American Association of Cancer Research werden Malignome des Pankreas und der Leber im Jahr 2030 aufgrund ihrer steigenden Inzidenz an zweiter und dritter Stelle der Krebstodesursachen nach dem Lungenkarzinom stehen und Malignome der Mamma, der Prostata und das kolorektale Karzinom bis 2030 diesbezüglich überholt haben. Diese Entwicklung ist exemplarisch auf den demographischen Wandel zurückzuführen, im Sinne eines höheren Durchschnittsalter einer Population und die Veränderungen im Lebensstil der Menschen, welche zu höheren Raten metabolischer Erkrankungen und assoziierter gesundheitlicher Folgen, beispielsweise Krebserkrankungen, führen (Rahib et al. 2014). Ursächlich für die ausgesprochen schlechte Prognose des Pankreaskarzinoms ist die meist erst späte Diagnosestellung aufgrund fehlender Frühsymptome. Erst in fortgeschrittenen Stadien finden sich Beschwerden wie Inappetenz, Gewichtsverlust, dumpfe Bauchschmerzen mit Ausstrahlung in den Rücken oder, bei Okklusion der ableitenden Gallenwege, ein Verschlussikterus (Lutz et al. 2008). Eine chirurgische Therapie mit kurativer Zielsetzung ist daher nur bei etwa 15-20 % der

Betroffenen möglich, doch auch diese Patienten versterben nahezu alle binnen 7 Jahren trotz primärer Resektabilität an ihrem Pankreasadenokarzinom (Garcea et al. 2008). Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium können einer palliativen Chemotherapie zugeführt werden, welche die durchschnittlichen Überlebenszeiten jedoch nur geringfügig verbessert (Gresham et al. 2014).

Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas gelten Tabakrauchen, chronische Pankreatitiden, hoher Alkoholkonsum, Diabetes mellitus, metabolisches Syndrom, eine positive Familienanamnese, sowie ein hohes Lebensalter (Vincent et al. 2011). Ferner werden Zusammenhänge mit einer *Helicobacter pylori*-Besiedelung und dem Vorliegen von Parodontitis diskutiert (Raimondi et al. 2009). Eine protektive Rolle des Blutgruppenantigens 0 ist beschrieben (Wolpin et al. 2009).

Als ursächlich für das schlechte Ansprechen von Chemotherapie, Radiatio und Immuntherapie gilt die beträchtliche intrinsische Apoptoseresistenz der Pankreaskarzinomzellen (Roder et al. 2011). Die Entwicklung neuer Therapieansätze beinhaltet die Aufdeckung dieser Mechanismen und den möglichen Einsatz gezielter Immunmodulatoren auf zellulärer Ebene.

1.2 Todesrezeptor-vermittelte Apoptose

Apoptose, auch bezeichnet als programmierter Zelltod, beinhaltet die genetisch determinierte Elimination von Zellen. Dies geschieht physiologisch während Entwicklung und Alterung des Zellverbandes und dient zur Kontrolle der Zellanzahl und damit der Größe von Geweben. Beschädigte Zellen werden so eliminiert und die Proliferation dieser potentiell gefährlichen Zellen verhindert. Die Apoptose kann auf verschiedenen Wegen eingeleitet werden. Besteht ein DNA-Schaden, so kann das Tumorseitenprotein p53 den Zelltod einleiten. Auch über die Zelloberflächenrezeptoren CD 95, TNFR und TRAIL-R kann mittels einer Signalkaskade Apoptose ausgelöst werden. Die genauen Mechanismen dieser intrazellulären Vorgänge sind sehr komplex. Man differenziert zwischen einem extrinsischen Weg, der über die Todesrezeptoren vermittelt wird und einem intrinsischen Weg, auch mitochondrialer Weg genannt. Beiden Wegen ist gemein, dass sie über den gleichen Effektor-Komplex Caspase-abhängig den Zelltod einleiten. Im Anschluss folgt die DNA-Fragmentierung, die Degradation des Zytoskeletts und nukleärer Proteine und schließlich die Phagozytose der Zellreste (Elmore 2007).

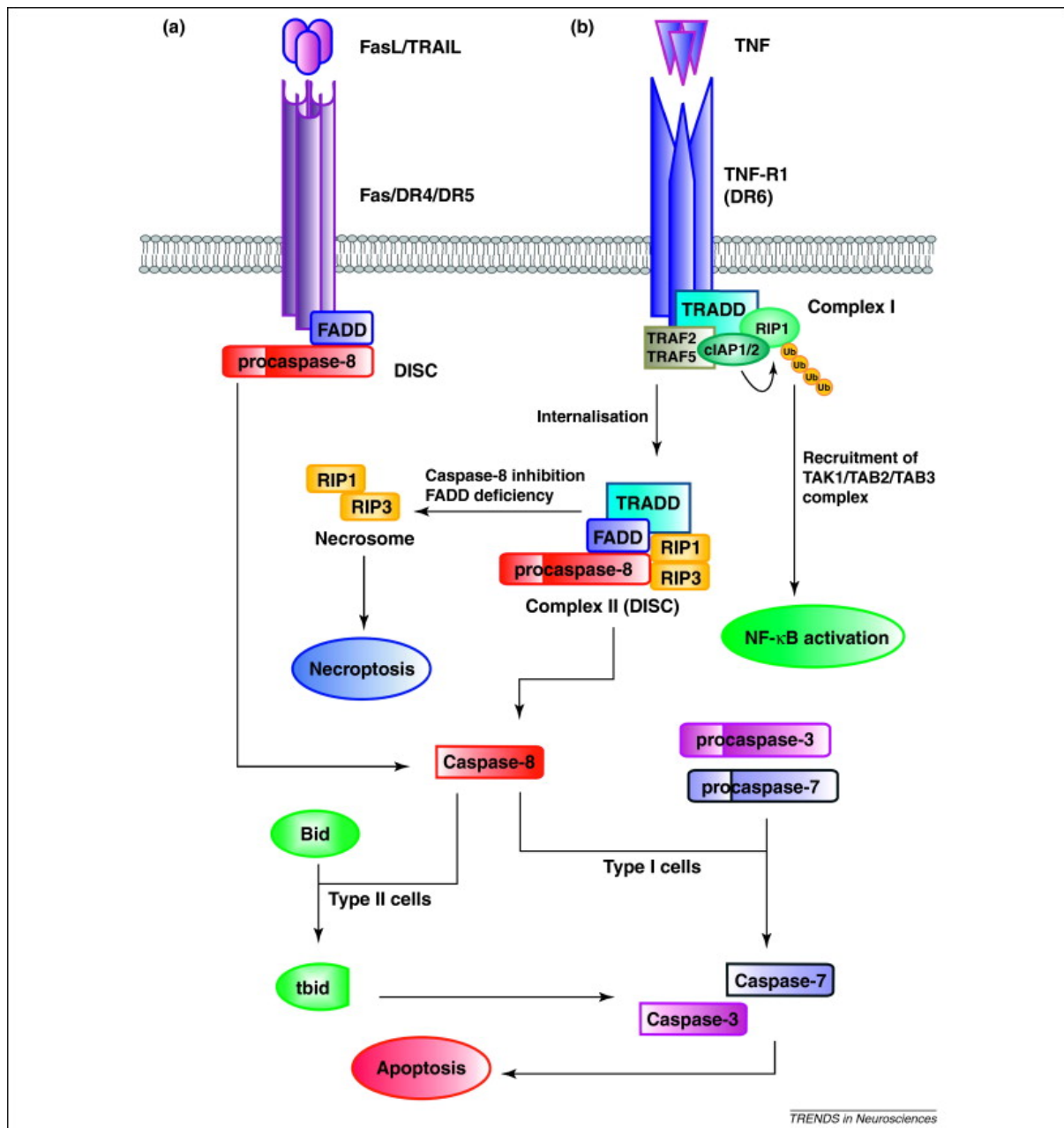


Abb. 1: Todesrezeptor-vermittelte Apoptose (Mc Guire et al. 2011)

Nachdem TNF- α an den TNF-R1 gebunden hat, wird der Primärkomplex (Complex 1), bestehend aus dem Rezeptor selbst, der Kinase Receptor-interacting protein 1 (RIP1), dem Adapterprotein TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) und dem Adapterprotein Tumor necrosis factor receptor type 1-associated Death domain protein (TRADD) gebildet. Anschließend dissoziieren RIP1, TRAF2 und TRADD vom Rezeptor und bilden mit Caspase-8 und dem Adapterprotein Fas-Associated protein with Death Domain (FADD) einen Sekundärkomplex (Complex 2). Dies stellt den extrinsischen Weg der Apoptose dar.

Wenn nun via Primärkomplex oder durch andere exogene Faktoren die Aktivierung von NF κ B induziert wird, fördert dieser Transkriptionsfaktor die Genexpression diverser

antiapoptotischer Proteine und die Aktivierung der Initiatorcaspasen (z.B. Caspase 8 oder 9) in Complex 2 wird auf diese Weise blockiert. Bleibt die Wirkung von NFκB hingegen aus, folgt in der Regel der Zelltod (Muppidi et al. 2004).

Zu den von NFκB induzierten antiapoptischen Proteinen gehören das cellular FLICE-like inhibitory protein (c-FLIP), welches in der Lage ist, die Aktivierung von Caspase 8 zu unterbinden (Irmeler et al. 1997). C-Flip ist ein Caspase 8-Homolog ohne Proteaseaktivität, welches ebenfalls an FADD bindet, aufgrund fehlender katalytischer Aktivität die Apoptose jedoch nicht induzieren kann (Chang et al. 2002). Eine etwas geringere antiapoptotische Potenz haben die weiteren Zielproteine von NFκB: TNFR-associated factor 1 und 2 (TRAF 1 und TRAF 2) und die inhibitor-of-apoptosis-Proteine c-IAP1 und c-IAP2, welche ebenfalls die Caspase 8-Aktivierung in der Zelle verhindern (Wang, C. Y. et al. 1998). Außer der Induktion antiapoptotischer Proteine vermittelt NFκB ein Überleben der Zelle auch über eine Interaktion mit der c-Jun N-terminal kinase (JNK). Während eine nur kurzzeitige Aktivierung von JNK mit einem Überleben der Zelle assoziiert ist, trägt eine verlängerte JNK-Aktivierung zum Zelltod bei. NF-κB hemmt die anhaltende Phase einer TNF-induzierten JNK-Aktivierung und bewahrt so die Zelle vor der Apoptose (Wullaert et al. 2006). In maligne transformierten Zellen findet sich häufig eine NFκB-Überaktivität und trägt zu deren Apoptoseresistenz bei. Als Transkriptionsfaktor reguliert NFκB die Expression verschiedener Gene, die zusätzlich die Tumorprogression unterstützen. Dazu gehört die Angiogenese über VEGF, verstärkte Metastasierungsraten mittels ICAM-1, Tumorstromaförderung durch die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie COX2 und IL-1 und die angeführten, auf zellulärer Ebene antiapoptotisch wirkenden, Proteine TRAF und IAP (Prasad, S. et al. 2010). Fehlt NFκB, wird die JNK-Aktivität durch den TNF-R1 aufrechterhalten und der proapoptotische BH3 interacting-domain death agonist (BID) aktiviert (Broaddus et al. 2005). Dessen Spaltprodukt tBID (trunkiertes BID) bewirkt eine Änderung der Permeabilität in der Mitochondrienmembran und es folgt die Freisetzung von proapoptotischen Proteinen aus den Mitochondrien (Wang, X. 2001). Dazu gehören Cytochrom c, apoptosis inducing factor (AIF), second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC/Diablo) und Endonuklease G. Smac stimuliert dann indirekt die Caspase 8 und der Zelltod folgt (Deng et al. 2003). Dies stellt den intrinsischen Apoptoseweg dar.

1.3 Tumornekrosefaktor α

Tumornekrosefaktor α ist ein multifunktionelles, proinflammatorisches Zytokin und hat eine Vielzahl an Aufgaben, so spielt es eine Rolle in der Regulation von Apoptose,

Zelldifferenzierung und Immunantwort. Es wird als Reaktion auf bakteriell-entzündliche oder tumoröse Prozesse sezerniert (Aggarwal et al. 1996; Granger et al. 1969; Helson et al. 1975). TNF- α ist normalerweise nicht in gesunden Individuen nachzuweisen, erhöhte Konzentrationen in Serum und Gewebe finden sich bei infektiösen oder inflammatorischen Prozessen (Robak et al. 1998), wobei die Höhe der TNF- α -Level mit der Schwere der immunologischen Prozesse korreliert (Waage et al. 1987).

Er wird hauptsächlich von Makrophagen, natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten sezerniert und ist in der Lage, die Lymphozytendifferenzierung zu beeinflussen (Beutler et al. 1985; van Horssen et al. 2006). Der TNF- α -Ligand liegt membrangebunden oder löslich vor und besteht aus drei Untereinheiten (Eck et al. 1989). TNF- α wird zunächst als ein in der Zellmembran verankerter Vorläufer (pro-TNF α , 26 kDa) synthetisiert und durch das TNF- α -Converting-Enzym (TACE/ADAM17) proteolytisch in die lösliche Form überführt (17kDa)(Moreira-Tabaka et al. 2012).

TNF- α entfaltet seine Wirkung über 2 Rezeptoren, TNF-R1 mit einer molekularen Masse von 55kDa und TNF-R2, 75kDa (Tartaglia et al. 1992; Vandenabeele et al. 1995). Bislang wurde die Expression von TNF-R1 auf jeder Zelle nachgewiesen, wohingegen TNF-R2 hauptsächlich auf Immun- und Endothelzellen exprimiert wird (Aggarwal 2003). Die Bindungsaffinität von TNF- α ist bei dem TNF-R2 fünfmal höher als bei dem TNF-R1, wobei dennoch letzterer hauptsächlich für die biologische Wirkung von TNF- α verantwortlich ist. Ursächlich dafür ist der Umstand, dass TNF-R1 eine Todesdomäne (Death Domain, DD) besitzt, die im TNF-R2 nicht vorhanden ist (Ashkenazi et al. 1998). TNF-R1 ist in der Lage, eine Apoptose der Zielzelle mittels Caspasekaskade auszulösen aber auch über NF κ B diverse zelluläre Mechanismen zu stimulieren (Muppidi et al. 2004). Es wurde beobachtet, dass TNF- α eine apoptotische Wirkung auf maligne Zellen besitzt (Vassalli 1992), systemisch appliziert wirkt TNF jedoch auch auf gesunde Zellen immens toxisch, so dass sich der systemische Einsatz von TNF für eine gezielte antitumoröse Therapie nicht eignet (French et al. 1999). Zudem sind viele Tumorzellen durch intrazelluläre Mechanismen resistent gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose (Roder et al. 2011; Wang, C. Y. et al. 1996).

1.4 CD95L

Im Jahre 1989 wurde erstmals ein Rezeptor beschrieben dessen Stimulation eine Apoptose maligner Zellen in vitro zur Folge hatte und zunächst als apoptosis antigen 1 (APO-1) bezeichnet wurde (Trauth et al. 1989). In der Literatur finden sich verschiedene Bezeichnungen, CD95, Fas und APO-1, alle Begriffe beziehen sich auf den gleichen

Rezeptor. Später wurde auch die Bedeutung seines Liganden als wichtige Komponente des programmierten Zelltods entdeckt (Matiba et al. 1997). Es ist ein aus 319 Aminosäuren bestehendes Typ 1 Transmembranprotein. Die extrazelluläre Todesdomäne ist charakteristisch für die TNF-Superfamilie und ähnelt in ihrer Struktur dem TNF-Rezeptor 1 (Itoh et al. 1991). Der Rezeptor ist sowohl auf der Oberfläche von Immunzellen, als auch in zahlreichen anderen Organen konstitutiv oder induzierbar zu finden (Leithauser et al. 1993).

Nach Stimulierung des CD95 durch seinen natürlichen Liganden CD95L oder mit einem agonistischen Antikörper, oligomerisiert der Rezeptor und es kommt zur Bildung eines Komplexes (DISC), der pro-Caspase-8-Moleküle mithilfe des Adapterproteins FADD rekrutiert (Wang, L. et al. 2010). Die Caspase 8 wird nach Bindung an die DED (death effector domain) des FADD aktiviert, vom Komplex gelöst und leitet die Signalkaskade ein, welche schließlich zum Untergang der Zelle führt (Rathmell et al. 1999).

Das CD95-System spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort und reguliert mittels des extrinsischen Apoptosewegs physiologisch die zelluläre Homöostase in Geweben.

In einigen Tumorzellen wurde ein verändertes Expressionsmuster von CD95 und seinem Liganden beobachtet (Peter et al. 2005). Eine Herabregulation der Rezeptordichte könnte einen Mechanismus darstellen, wie sich Tumorzellen der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose entziehen. Über den Rezeptor CD95 können auch nicht-apoptotische Signalwege vermittelt werden, welche die Aktivierung von NF κ B und MAP-Kinase nach sich ziehen und das Tumorstadium fördern. Dies betrifft insbesondere Zellen, die resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose sind (Trauzold et al. 2001; Peter et al. 2007). In Ergänzung dazu, könnten erhöhte Level des Liganden dazu beitragen, Tumor-infiltrierende Lymphozyten unschädlich zu machen und damit ebenfalls das Überleben der Tumorzellen zu fördern. Es wurde postuliert, dass Tumorzellen, unabhängig von ihrer Sensibilität gegenüber CD95-vermittelter Apoptose, auf eine konstitutive Anwesenheit von CD95 angewiesen sind, um optimal zu wachsen. Sie sezernieren aus diesem Grunde selbst den CD95L, welcher über den JNK-Signalweg diverse Proteine modifiziert und auf diesem Wege unter anderem Wachstum und Differenzierung der Tumorzellen fördert (Bode et al. 2007; Chen, L. et al. 2010).

1.5 TRAIL

Die apoptoseinduzierende Wirkung von Tumour necrosis factor apoptosis inducing ligand (TRAIL, Apo2L) ist seit der Erstbeschreibung 1995 (Wiley et al. 1995) in diversen Versuchsreihen nachgewiesen worden (Pitti et al. 1996; Walczak et al. 1999). Gesundes

Gewebe war bei der Behandlung nicht betroffen, maligne Zellen reagierten jedoch häufig sensibel auf die Behandlung mit dem Untergang des Zellverbandes (French et al. 1999). TRAIL ist ein Mitglied der TNF-Superfamilie und ein Typ II Transmembranprotein. Wie andere Liganden aus dieser Familie, besitzt TRAIL eine Trimerstruktur. Durch eine Protease kann ein Teil dieses Komplexes abgespalten werden und eine lösliche Form des Liganden entsteht, dies wird insbesondere durch aktivierte Neutrophile Granulozyten und Monozyten induziert (Kimberley et al. 2004; Tecchio et al. 2004). Die Hauptfunktionen von TRAIL sind die Induktion von Apoptose über den extrinsischen Todesrezeptorweg mit Produktion von aktiver Caspase 8, aber auch die Stimulierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Walczak et al. 2000). Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von TRAIL lag die Vermutung nahe, dass die recht selektive Wirkung von TRAIL durch verschiedene TRAIL-Rezeptoren oder deren limitierte Expression bedingt ist (Wiley et al. 1995). Es sind 5 TRAIL-Rezeptoren bekannt. TRAIL-R1 (auch bezeichnet als death receptor 4, DR4) und TRAIL-R2 (death receptor 5, DR5) besitzen jeweils eine, dem TNF-R1- und CD95-homologe, intrazelluläre Todesrezeptordomäne über die mittels Einleitung des extrinsischen Apoptosewegs der Untergang der Zielzelle ausgelöst werden kann. TRAIL-R3, via GPI (glycosylphosphatidylinositol)-Anker an die Zelloberfläche gebunden, weist keine intrazelluläre Domäne auf und ist nicht zur Apoptoseinduktion fähig. TRAIL-R4 besitzt eine verkürzte unvollständige DD und kann keinen Zelltod vermitteln, jedoch NF κ B aktivieren (Degli-Esposti/Dougall et al. 1997). Man geht davon aus, dass TRAIL-R3 und TRAIL-R4 als Decoy-Rezeptoren fungieren („Lockvogel“) und mittels kompetitiver Bindung von TRAIL die Apoptose über DR4 und DR5 inhibieren. Das lösliche Osteoprotegerin (OPG), hauptsächlich Zielrezeptor für RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), kann ebenfalls TRAIL binden und spielt eine Rolle in der Osteoclastenregulation (Emery et al. 1998). Die Bindungsaffinitäten der TRAIL-Rezeptoren sind unterschiedlich, so weist TRAIL-R2 die höchste und OPG-R die niedrigste Affinität auf (Kruyt 2008; Truneh et al. 2000). Während die mRNA für TRAIL-R1, TRAIL-R2 und TRAIL-R4 in Zellen vieler Gewebe nachweisbar sind, findet sich TRAIL-R3- Expression hauptsächlich in peripheren Blutlymphozyten und in der Milz (Degli-Esposti/Smolak et al. 1997). Die mRNA-Expression einer Zelle lässt jedoch nicht sicher auf deren tatsächliche Oberflächenrezeptorexpression schließen (Zhang et al. 1999). In der Arbeitsgruppe von PD Dr. A. Trauzold konnte zum ersten Mal im Tierversuch nachgewiesen werden, dass TRAIL auch in der Lage ist, die Invasion von apoptoseresistenten PDAC-Zellen in vitro zu stimulieren und die Fernmetastasierung in vivo zu fördern (Trauzold et al. 2006). Eine genauere Erforschung der

nicht-apoptotischen Signalwege von TRAIL in Apoptose-resistenten Zellen ist nötig, um dessen möglichen Einsatz im klinischen Bereich evaluieren zu können.

1.6 Ursachen der Apoptoseresistenz im TRAIL-vermittelten Signalweg

Die Gründe für eine TRAIL-Resistenz werden in verschiedenen Artikeln kontrovers diskutiert. Multiple Faktoren scheinen einen Schutz vor der zytotoxischen Wirkung von TRAIL zu bieten.

1. Überexpression antiapoptotischer Proteine:

Abhängig von der weiteren Signaltransduktion nach Bindung des Todesliganden unterscheidet man 2 Zelltypen. In Typ 1-Zellen folgt nach der Ligandenbindung der extrinsische Apoptoseweg mit ausgeprägter Aktivierung der Caspase 8 und konsekutivem Ablauf der Caspase-Kaskade. In einem signalverstärkenden Rückkopplungsmechanismus werden weitere Caspase 8-Moleküle aktiviert. Die untersuchten Pankreaskarzinomzellen sind Typ 2-Zellen, in ihnen wird die Caspase 8 nur schwach aktiviert und der mitochondriale Apoptoseweg läuft zusätzlich ab (Hinz et al. 2000).

Eine Überexpression von Bcl-2-oder Bcl-xL inhibiert bei beiden Zelltypen zunächst die Freisetzung proapoptotischer Faktoren. Während in Typ 1-Zellen die hohe Menge an aktivierter Caspase 8 den Zelltod dennoch einleitet, kann in Typ 2-Zellen auf diese Weise die Apoptose verhindert werden (Peter et al. 2003). Anhand von Pankreaskarzinomgewebe wurde nachgewiesen, dass eine hohe Bcl-xL- Expression mit schlechteren Überlebensraten assoziiert (Friess et al. 1998). Die antiapoptotische Wirkung von Bcl-xL durch Inhibition der Effekte von TNF, TRAIL und CD95-Ligand steigert die Überlebensfähigkeit der Tumorzellen und setzt die Sensibilität von PDAC-Zellen gegen apoptoseinduzierende Therapien herab.

Eine weitere Möglichkeit einer Resistenzursache ist die Überexpression des antiapoptotisch wirksamen Proteins cFLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein). FLIP ist über eine kompetitive Hemmung der Caspase-8-Funktion in der Lage eine TRAIL-induzierte Apoptose zu vermeiden. In TRAIL-resistenten Melanomzelllinien wurden auf Proteinexpressionsebene jeweils hohe Level an FLIP nachgewiesen, wohingegen TRAIL-sensible Melanomzellen niedrige oder nicht nachweisbare FLIP-Spiegel aufwiesen. Möglicherweise determiniert die Konzentration von FLIP also, ob eine Zelle empfänglich für TRAIL-induzierte Apoptose ist (Griffith et al. 1998; Irmeler et al. 1997). Andere Arbeitsgruppen wiesen allerdings keinen derartigen Zusammenhang wie bei den Melanomzellen nach (Zhang et al. 1999).

2. NFκB als möglicher Mechanismus der TRAIL-Resistenz:

Vermehrte Expression anti-apoptotischer oder verminderte Expression pro-apoptotischer Proteine (Caspase 8, 10) wurde in unterschiedlichsten Tumorentitäten als ein möglicher Mechanismus für verminderten oder aufgehobenen Todesliganden-induzierten Zelltod nachgewiesen. Die TRAIL-induzierte Aktivierung des NFκB-Signalwegs besitzt diesbezüglich besonderes Potential, da dieser eine Vielzahl an Zielgenen beeinflusst, deren Proteine mit Apoptose-modulierenden oder anti-apoptotischen Eigenschaften einhergehen (beispielsweise IAP1 und IAP2, Bcl-xL, Bcl-2 oder cFLIP) (Wang, C. Y. et al. 1998). Nicht nur die Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 können NFκB stimulieren, sondern auch TRAIL-R4. Für TRAIL-R3 wurde dieser Mechanismus nicht beobachtet (Degli-Esposti/Dougall et al. 1997).

3. Unterschiedliche Expression von TRAIL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche kann dessen Wirkung regulieren:

Nur TRAIL-R1 und TRAIL-R2 sind in der Lage mittels ihrer cytoplasmatisch lokalisierten Todesdomäne einen Zelltod auszulösen. TRAIL-R3 besitzt keine, TRAIL-R4 nur eine verkürzte und funktionsunfähige Todesdomäne. Es wird vermutet, dass diese beiden Rezeptoren dazu dienen, kompetitiv die apoptotische Wirkung von TRAIL an TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zu antagonisieren. Es wurde initial vermutet, dass das Expressionsmuster dieser 4 Rezeptoren die TRAIL-Sensitivität einer Zelle definiert. Es scheint hingegen eher wahrscheinlich, dass die TRAIL-Resistenz durch intrazelluläre Regulationsmechanismen zustande kommt (Walczak et al. 2000).

1.7 Ziel der Arbeit

Duktale Adenokarzinomzellen des Pankreas weisen häufig, trotz Expression entsprechender Rezeptoren, eine beträchtliche Resistenz gegenüber Todesrezeptor-vermittelter Apoptose auf (Trauzold et al. 2001; Ungefroren et al. 2001). Damit sind die Effekte von Chemotherapeutika und Strahlentherapie limitiert, denn ihre Wirkung wird häufig indirekt über den programmierten, Todesrezeptor-vermittelten Zelltod entfaltet (Belka et al. 2003; Roder et al. 2011). Dem Transkriptionsfaktor NFκB kommt eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose zu und wird durch die verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Rezeptorsysteme moduliert. Die Beobachtung, dass Todesrezeptoren in Tumoren hochreguliert sind, wurde vielfach beschrieben, über eine vergleichende Analyse der verschiedenen Rezeptorsysteme in einem Tumorkollektiv liegen jedoch kaum Daten vor. Motiviert ist diese Arbeit auch durch

die Beobachtung, dass Todesrezeptoren häufig koexprimiert sind, etwaige Zusammenhänge oder prognostische Folgen dieser Kombinationen in der Literatur aber kaum beschrieben sind. Die Prognose einer Tumorerkrankung wird entscheidend durch das Ansprechen der Tumorzellen auf den Todesrezeptor-vermittelten Zelltod beeinflusst.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Expression von TRAIL-R1/-R2/-R4, CD95 und TNFR-1 und ihrer Liganden in PDAC-Zellen mit der Überlebensrate der Patienten korreliert. Dabei wird das Augenmerk auf die subzelluläre Rezeptor- und Ligand-Verteilung in den Tumorzellen gelegt und untersucht, ob diese Verteilung eine prognostische Relevanz hinsichtlich der Überlebenszeiten besitzt. Desweiteren wird die Koexpression der untersuchten Antigene analysiert. Es werden Fälle betrachtet, die zur besseren Vergleichbarkeit alle das Tumorstadium T3N1 aufweisen. Die mikroskopische Auswertung erfolgt über ein Scoring-System, welches dann statistisch analysiert werden soll.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Zubehör

Tab. 1: Verwendete Materialien

Gerät/ Material	Hersteller
Deionisiertes Wasser (dH ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schnellkochtopf, Modellnummer 22020	Haushalt International, Oldenburg
Kochplatte	Dräger, Lübeck
Hämalaun	Dr. K. Hollborn und Söhne, Leipzig
Peroxidaseblock REF TA-125-HP	Thermo Scientific, Waltham, USA
UV-Block REF TA-125-UB	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikrotom Leica RM2245	Leica, Wetzlar
Mounting Medium	Medite GmbH, Burgdorf
Objektträger SuperFrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Chromogen DAB SK-4100	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Mikroskop Leica DM 1000	Leica, Wetzlar
Wippschüttler SSL4	Stuart, Staffordshire, UK
Trockenschrank B28	Binder, Tuttlingen
Zentrifuge GMC 060	Neo-Lab, Heidelberg
Antibody Diluent REF ZUC025-500	Zytomed, Berlin
Kühlplatte PSI	Laudenbach
Trizma Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt

2.1.2 Rezepte der Pufferlösungen für IHC:

- TBS-Puffer, 10fach konzentrierte Stammlösung
 - 60,57 g Tris Base
 - 87,66 g Natriumchlorid
 - Gelöst in 1 Liter dH₂O, pH mit HCl auf 7,4 eingestellt
- Citratpuffer, 10fach konzentrierte Stammlösung
 - 29,41 g NaCitrat
 - Gelöst in 1 Liter dH₂O, pH mit Zitronensäure auf 6,0 eingestellt
- TRIS-HCl-Puffer, 10fach konzentrierte Stammlösung
 - 121,1 g Tris Base
 - Gelöst in 800 ml dH₂O
 - pH mit HCl auf 7,0 eingestellt

- EDTA, 10fach konzentrierte Stammlösung
 - Tris Base 12.1 g
 - EDTA 3.70 g
 - Gelöst in 1 Liter dH₂O, pH auf 8,0 eingestellt

2.1.3 Antikörper

Tab. 2: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
TRAIL-Rez 1-Ak 1.02	Zur Verfügung gestellt von Prof. H. Walczack, London	1:200
TRAIL-Rez 2-Ak 2.21	Zur Verfügung gestellt von Prof. H. Walczack, London	1:150
TRAIL-Rez 4-Ak 4.18	Zur Verfügung gestellt von Prof. H. Walczack, London	1:150
TRAIL-Ligand, sab3500424	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	1:1000
HMGA2, sc-23684	Santa Cruz, Heidelberg	1:150
TNF-Rez. 1-Ak, ab19139	Abcam, Cambridge, England	1:400
TNF-Ligand, ab6671	Abcam, Cambridge, England	1:300
CD95-Rez.-Ak, ABIN97060	Antibodies Online, Aachen	1:350
Sekundärantikörper Peroxidase-Polymer	Histofine, Nichirei Biosciences, Tokio	
Anti-Mouse + Anti-Rabbit Simple Stain Max PO Multi		
Anti-Goat Simple Stain Max PO (G)		

Hinichtlich Spezies und Klonalität der Antikörper siehe Tab. 3.

2.1.4 Gewebeproben

Untersucht wurden 41 Proben von duktaalen Adenokarzinomen des Pankreas. Die Proben aus den Jahren 1999-2009 stammten aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Zur besseren Vergleichbarkeit der Gewebe wurden nur Patienten im TNM-Stadium pT3N1 ausgewählt. Die Gewebeproben wurden im Rahmen der operativen Therapie gewonnen, zur weiteren Verarbeitung in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert. In den anschließend durchgeführten Färbeserien wurden nicht in allen 41 gefärbten Fällen Tumorzellen identifiziert. Dies ist darauf zurückzuführen, dass auf wenigen Gewebeproben nach Herstellung der histologischen Schnitte die Tumorzellnester abgetragen und im verbliebenen Gewebe keine Tumorzellen mehr vorhanden waren.

2.1.5 Gewebsschnitte

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Serienschnitte hergestellt. Die Paraffinblöcke wurden auf einer Kühlplatte bei ca -15° Celsius heruntergekühlt. Mithilfe eines Mikrotoms wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 2 Mikrometern hergestellt, auf Objektträger aufgezogen und im Wasserbad gestreckt. Zum Trocknen wurden die Schnitte über Nacht in den Schnelltrockner eingebracht und bei 56°Celsius getrocknet. Die weitere Lagerung erfolgte bis zur Färbung bei 4° Celsius.

2.2 Methoden

2.2.1 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, um Antigene im Gewebe histologisch sichtbar zu machen. Der Nachweis gelingt mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Mithilfe verschiedener Detektionssysteme werden die gebundenen Antikörper über ein Chromogen sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurde die indirekte immunhistochemische Methode gewählt. Nach Auftragung des Primärantikörpers folgt die Aufbringung eines Sekundärantikörpers, an den Peroxidase gekoppelt ist. Die Peroxidase setzt das Chromogen enzymatisch um und ein farbiges Produkt entsteht. Auf diese Weise können schon geringe Antigenmengen durch eine Verstärkung des Farbsignals nachgewiesen werden.

Im Wesentlichen besteht eine immunhistochemische Färbung aus einer Schnittvorbehandlung, dem sogenannten Antigen Retrieval, der Inkubation und Bindung der Antikörper und des Sichtbarmachens dieser Reaktion mithilfe eines Chromogens.

2.2.2 Antikörperetablierung

Um ein optimales Farbsignal zu erhalten, wurden vor der Färbung der Kohortenproben einige Etablierungsfärbungen mit jedem Antikörper vorgenommen. Dabei wurden Großschnitte und TMAs (Tissue Mikro Arrays) von Pankreaskarzinomen oder anderen Geweben mit positiv zu erwartendem Farbergebnis wie Magen-, Colon- und Mammatumoren verwendet und verschiedene Parameter des Färbeprotokolls variiert. Dazu zählen der pH-Wert des Puffers und die Dauer der Hitzebehandlung beim Antigen Retrieval. Neben der Verdünnung des Primärantikörpers spielen auch dessen Inkubationszeit und -temperatur eine Rolle. Eine der Reaktion über Nacht bei 4° C vorausgehende Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten ergab bei einigen Antikörpern ein besseres Farbresultat als der Verzicht auf diesen Arbeitsschritt. Ein weiterer Parameter sind die unterschiedlichen Wirkzeiten des Chromogens.

Ziel war eine ausreichende Anfärbung der Zielantigene bei möglichst geringer Hintergrundfärbung.

2.2.3 Schnittvorbehandlung

Im ersten Schritt wurde das Paraffin aus den Schnitten durch Xylol entfernt. Die folgende absteigende Alkoholreihe dient der Entfernung des Xylols und der Rehydrierung des Schnitts, da die Immunreaktion in wässrigen Medien erfolgt. Durch die Formalinfixierung kommt es zu einer Quervernetzung der Proteine, welche rückgängig gemacht werden muss, um die Antikörperbindung zu ermöglichen (Antigen Retrieval). Die Schnitte wurden in einer Pufferlösung für eine bestimmte Zeit auf eine definierte Temperatur erhitzt. Die verwendeten Puffer unterscheiden sich in ihren pH-Werten und im Zuge der Antikörperetablierung wurde der optimale Puffer für den jeweiligen Antikörper gewählt. Es wurde zwischen einem kurzen Erhitzungsvorgang (Erhitzen bis auf 99° Celsius, dann Ausschalten der Kochplatte und Belassen der Schnitte in der Küvette für weitere 5 Minuten im geschlossenen Schnellkochtopf, anschließend schonendes Abkühlen) und einem langen Erhitzungsvorgang (Erhitzen bis auf 99° Celsius, dann Ausschalten der Kochplatte, Belassen der Schnitte in der Küvette für 10 Minuten im geschlossenen Schnellkochtopf, anschließend wiederum Erhitzung auf 99° Celsius, Belassen der Schnitte in der Küvette für 5 Minuten im geschlossenen Schnellkochtopf, dann schonendes Abkühlen) differenziert. Eine Alternative zur Hitzevorbehandlung ist das Hinzufügen einer Proteinase (z.B. Trypsin) zur Antigendemaskierung.

Es folgte ein 5-minütiger Waschschrift in TBS (Tris Buffered Saline), welcher dazu beiträgt, einen konstanten pH-Wert aufrechtzuerhalten.

Die endogene Peroxidase wurde durch eine Inkubation mit H₂O₂ über einen Zeitraum von 15 Minuten blockiert. Andernfalls würde die Peroxidase das Chromogen umsetzen und ein unerwünschtes unspezifisches Farbsignal hervorrufen.

Anschließend folgten 3 Spülgänge mit der Pufferlösung TBS für jeweils 5 Minuten.

Um eine unerwünschte Hintergrundfärbung durch die Blockade unspezifischer Proteinbindestellen zu reduzieren, wurde nun für 5 Minuten eine Inkubation mit dem „UltraV-Block“ durchgeführt. Mit diesem Schritt verhindert man die Anheftung des Primärantikörpers an unspezifische Immunglobuline auf dem Gewebeschnitt.

2.2.4 Primärantikörper

Nach einem 2 x 3-minütigen Spülgang mit TBS wurden ca 150 µg der Primärantikörperlösung aufgetragen. Die entsprechenden Antikörper wurden je nach Konzentration in Antibody Diluent verdünnt. Gängige Inkubationsmethoden sind die Inkubation bei 4° C über Nacht und die Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Bei 4° C binden eher die hochaffinen Antikörper und die Hintergrundfärbung wird reduziert. Die Primärantikörper sind unkonjugiert und häufig mono- oder polyklonale Maus- oder Kaninchenantikörper. Begleitend wurde jeweils auch eine Negativprobe hergestellt, auf die nur Antibody Diluent ohne Primärantikörper aufgetragen wurde.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit, meist über Nacht, wurden die Schnitte erneut 3 x 5 Minuten mit TBS gespült. Im Anschluss folgte die Aufbringung des Sekundärantikörpers, gerichtet gegen Maus-, Kaninchen-, oder Ziegenimmunglobuline, welcher sich wiederum an die gebundenen Primärantikörper heftete. Der jeweils speziesspezifische und Peroxidasehaltige Sekundärantikörper inkubierte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.

Nach einem 3x5-minütigen Spülgang mit TBS wurde das Chromogen zur Sichtbarmachung der gebundenen Antikörper aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte mit der Polymer-Methode. Das DAB dient als Substrat für die am Sekundärantikörper befindliche Peroxidase. Enzymatisch umgesetzt resultiert aus dem über 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubierten DAB schließlich ein braunes Farbsignal.

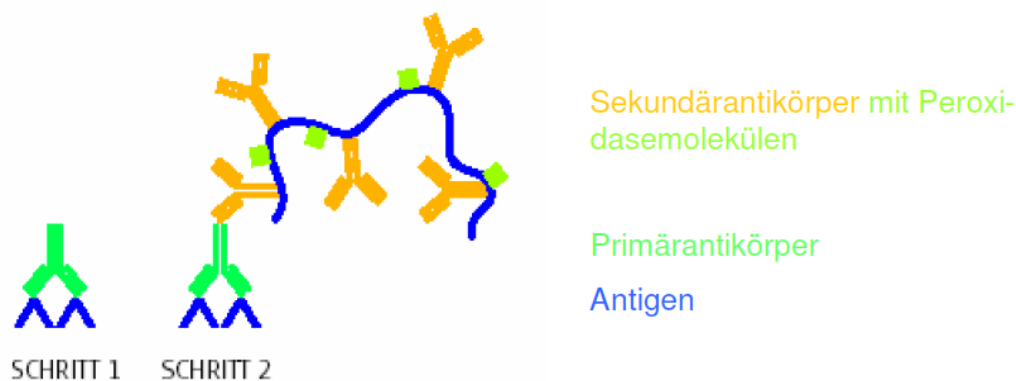


Abb.2: Polymer-Methode, aus: Boenisch T. Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden. 3. Auflage. DakoCytomation GmbH Hamburg; 2003

Im Anschluss folgte ein 5-minütiger Spülgang in dH₂O. Zur besseren Orientierung auf dem Schnitt folgte eine 1-minütige Gegenfärbung mit Hämalaun, welches anschließend 5 Minuten unter warmem fließendem Leitungswasser gebläut wurde.

Die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50%-iges Ethanol, 70%-iges Ethanol, 96 %-iges Ethanol, Xylol) entwässert und mit Mounting Medium eingedeckt.

2.2.5 Basisprotokoll für IHC-Färbungen:

Tag 1:

1. Absteigende Alkoholreihe:
 1. Xylol 2x10 min
 2. 96% Ethanol 2x2 min
 3. 70% Ethanol 2x2 min
 4. 50% Ethanol 2x2 min
 5. Deionisiertes H₂O 2x2 min
 6. Frisches deionisiertes H₂O 1x2 min
2. Erhitzen im Schnellkochtopf: Topf mit deionisiertem H₂O gefüllt bis zum Meniskus der Küvette. Die jeweilige Pufferlösung in die Küvette einfüllen, zum Kochen bringen.
 1. Kurze Variante: Erhitzen bis auf 99° Celsius, Kochplatte ausschalten, geschlossenen Topf an den Rand der Kochplatte stellen und 5 min warten. Schnitte langsam mit Leitungswasser abkühlen
 2. Lange Variante: Erhitzen bis auf 99° Celsius, dann Ausschalten der Kochplatte, Belassen der Schnitte in der Küvette für 10 Minuten im geschlossenen Schnellkochtopf, anschließend wiederum Erhitzung auf 99° Celsius, Belassen der Schnitte in der Küvette für 5 Minuten im geschlossenen Schnellkochtopf, dann schonendes Abkühlen
3. Pufferlösung TBS 1x5 min
4. Peroxidaseblock auftragen, Inkubation 15 min bei Raumtemperatur
5. Pufferlösung TBS 3x5 min
6. UV-Block auftragen, Inkubation 5 min bei Raumtemperatur
7. Pufferlösung TBS 2x3min
8. Antikörperlösung mit Antibody Diluent herstellen und auf die Schnitte pipettieren (ca 150 µg pro Schnitt), je nach Antikörper zunächst 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen oder direkt über Nacht bei 4°C in den Kühlschrank

Tag 2

9. Pufferlösung TBS 3x5min
10. Sekundärantikörper: Peroxidase-Polymer auftragen, Inkubation 30 min bei Raumtemperatur
11. Pufferlösung TBS 3x5min

12. DAB-Lösung herstellen: 2,5ml dest.Wasser, 40 µl Pufferlösung, 80 µl DAB-Stammlösung, 40 µl H₂O₂ (1 Tropfen entspricht 40 µl), Inkubation 6-10 min bei Raumtemperatur

13. Deionisiertes H₂O 5 min

14. Hämalan 1 min

15. In fließendem Leitungswasser bläuen für 5 min

16. Deionisiertes H₂O 2 min

17. Aufsteigende Alkoholreihe:

1. Deionisiertes H₂O 2x1 min
2. 50% Ethanol 2x1 min
3. 70% Ethanol 2x1 min
4. 96% Ethanol 2x1 min
5. Xylol 2x1 min

1. DAB-Lösung herstellen: 2,5ml dest.Wasser, 40 µl Pufferlösung, 80 µl DAB-Stammlösung, 40 µl H₂O₂ (1 Tropfen entspricht 40 µl), Inkubation 6-10 min bei Raumtemperatur

2. Deionisiertes H₂O 5 min

3. Hämalan 1 min

4. In fließendem Leitungswasser bläuen für 5 min

5. Deionisiertes H₂O 2 min

6. Aufsteigende Alkoholreihe:

1. Deionisiertes H₂O 2x1 min
2. 50% Ethanol 2x1 min
3. 70% Ethanol 2x1 min
4. 96% Ethanol 2x1 min
5. Xylol 2x1 min

7. Mit Mounting Medium eindecken

Tab.3 2.2.6 Übersichtstabelle Färbeprotokolle

The image displays a 16x8 grid of small, square plots. Each plot contains a complex pattern of vertical lines and horizontal bands, suggesting a data visualization or a sequence of images. The patterns vary across the grid, with some plots showing more prominent vertical lines and others showing more horizontal bands. The overall appearance is that of a large, multi-panel figure, possibly representing a time series or a sequence of data points.

* langes Kochen: Erhitzen bis auf 99° Celsius, dann Ausschalten der Kochplatte, Belassen der Schnitte in der Küvette für 10 Minuten im geschlossenen Schnellkochtopf, anschließend wiederum Erhitzung auf 99° Celsius, Belassen der Schnitte in der Küvette für 5 Minuten im geschlossenen Schnellkochtopf, dann schonendes Abkühlen.

** kurzes Kochen: Erhitzen bis auf 99° Celsius, Kochplatte ausschalten, geschlossenen Topf an den Rand der Kochplatte stellen und 5 min warten. Schnitte langsam mit Leitungswasser abkühlen.

2.2.7 Einfluss des Schnittalters auf das Farbergebnis

Nach der Etablierung der Färbeprotokolle erfolgte die Färbung der PDAC-Kohorte. Von den Paraffinblöcken wurde etwa 1 Jahr zuvor Schnitte hergestellt und in der Zwischenzeit bei 4°C gelagert. In der mikroskopischen Auswertung der Färbeserien fiel dann eine deutlich schwächere Immunreaktivität auf, als die Etablierungsreihen mit den entsprechenden Antikörpern erwarten ließen. Wir führten anschließend vergleichende Färbeserien mit länger gelagerten und frisch geschnittenen Fällen des gleichen Tumorblocs in einem Färbedurchgang durch und erhielten durchweg stärkere Farbreaktionen für die verschiedenen untersuchten Parameter in den neu geschnittenen Gewebeschnitten. Daraufhin erstellten wir frische Gewebeschnitte von der PDAC-Kohorte und wiederholten die bereits durchgeführten Kohortenfärbungen an den frischen Schnitten. Dieser Umstand bedingt auch, dass auf manchen Blöcken nach häufiger Bearbeitung am Mikrotom kein Tumorgewebe mehr vorhanden war und die Anzahl der auswertbaren Schnitte in dem Ergebnisteil variiert. In der erneuten mikroskopischen Auswertung zeigten sich durchschnittlich höhere Scoringwerte in den frisch geschnittenen Fällen. So ließ sich überdies auch in zuvor als hinsichtlich unterschiedlicher Parameter negativ bewerteten Fällen eine schwache bis mäßige Immunreaktivität beobachten.

2.2.8 Mikroskopische Auswertung

Unter Vorlage der zugehörigen Hämatoxylin-Eosin-Schnitte erfolgte zunächst die Identifizierung der Tumorzellverbände. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mithilfe eines Scoring Systems. Berücksichtigt wurden die Farbtintensität und die prozentuale Anzahl der signalpositiven Adenokarzinomzellen, jeweils getrennt für Zytoplasma und Nukleus der Tumorzellen.

Tab. 4: Scoringschema für die mikroskopische Auswertung

Punkte	Färbeintensität	Punkte	Anzahl positiver Zellen
0	negativ	0	0%
1	Schwach positiv	1	<10%
2	Mäßig positiv	2	10-50%
3	Stark positiv	3	51-80%
4	-	4	81-100%

Aus dem Score für Zellkern und Zytoplasma wurde durch Addition beider Werte das intrazelluläre Gesamtvorkommen („Gesamtscore“) der Antigene zusammengefasst. In der Mehrheit der vorliegenden Arbeiten über die TRAIL-Rezeptoren wurde nicht zwischen Kern- und Zytoplasmaexpression unterschieden, da davon auszugehen ist, dass ein Austausch zwischen Nukleus und Zytoplasma der Zellen besteht. So wurden in den meisten vorangegangenen Arbeiten nukleäre Expressionen beobachtet, ohne sie extra gewertet zu haben (Bertsch et al. 2014). Dieser Umstand rechtfertigt zusätzlich neben der getrennten Analyse der Antigenvorkommen in Kern und Zytoplasma eine zusammenfassende Betrachtung der gesamten intrazellulären Expression.

Tab. 5: Tabellarische Aufstellung für die mikroskopische Auswertung

E-Nummer	Intensität Zytoplasma	Anzahl Zellen mit pos.Zytoplasma	Score Zytoplasma	Intensität Kernfärbung	Anzahl pos. Kerne	Score Kerne	Gesamtscore
xxxxx/xx	x	x	x	x	x	x	x

2.2.9 Statistische Auswertung

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Statistik-Programm IBM SPSS 19 (IBM Corporation, Armonk, NY).

Für die Überlebensanalysen wurde das Kaplan-Meier-Verfahren verwendet. Das Anfangsdatum der Überlebenszeit bildete das OP-Datum samt Probenentnahme, als Endpunkt galt das Todesdatum des Patienten. Die Zeiträume für das Patientenüberleben wurden in Monaten angegeben. Alle Pankreaskarzinompatienten, deren Gewebe in dieser Arbeit untersucht worden sind, sind mittlerweile verstorben. Ihre Überlebensdaten liegen dem Institut für Experimentelle Krebsforschung UKSH Campus Kiel vor und sind für die Berechnungen verwendet worden. Die der Überlebensanalyse zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt, mit welchem sich die Überlebensraten zweier unverbundener Stichproben untersuchen lassen. In der Kaplan-Meier-Testung wurden die erhobenen Werte

für Rezeptoren und Liganden so dichotomisiert, dass in beiden Gruppen jeweils eine homogene Anzahl von Elementen für die vergleichenden Analysen zur Verfügung steht. Dabei wurde mit den Daten aus dem mikroskopischen Scoring folgendermaßen verfahren:

Intensität Zytoplasma:	0; 1	→0	2; 3	→1
Anzahl Zellen mit positivem Zytoplasma:	0; 1; 2; 3	→0	4	→1
Intensität Kernfärbung:	0; 1	→0	2; 3	→1
Anzahl Zellen mit positivem Kern:	0; 1	→0	2; 3; 4	→1

Zum Vergleich der dichotomisierten Gruppen wurden die Medianwerte herangezogen und Standardfehler sowie Konfidenzintervall errechnet.

Bezüglich einer Korrelationsanalyse hinsichtlich der Expression der untersuchten Antigene wurde die Testung nach Kendalls τ verwendet. Kendalls τ ist ein Rangkorrelationskoeffizient für ordinale Daten. Sein Wert liegt zwischen 0 (kein Zusammenhang) und ± 1 (starker positiver bzw. negativer linearer Zusammenhang). Auch hier erfolgte der Test auf die statistische Signifikanz (p).

2.2.10 Koexpression der untersuchten Rezeptoren und Liganden

Die 41 untersuchten Fälle wurden jeweils mit 8 Antikörpern gefärbt. Im Folgenden wurde untersucht, ob eine statistisch signifikante Koexpression zweier Rezeptoren oder ein gleichzeitiges Vorhandensein von Rezeptor und Ligand zu beobachten ist. Dazu wurden die verschiedenen Parameter mit dem Korrelationskoeffizienten Kendall τ_b untersucht. Kendall τ_b ist ein Zusammenhangsmaß für symmetrische ordinale Daten und kann Werte zwischen 0 (kein Zusammenhang) und ± 1 (starker positiver bzw. negativer linearer Zusammenhang) annehmen. Der Test auf die statistische Signifikanz (p) erfolgte zweiseitig. Es resultiert eine Tabelle, deren Werte gespiegelt aufgeführt sind (siehe Tab.6):

Tab.6: Schema Korrelationstabelle τ : Rangkorrelationskoeffizient Kendall τ ; p: Signifikanzwert p; N: Anzahl der untersuchten Fälle

		TRAILR1	TRAILR2	TRAILR4
TRAILR1	τ	1,000	X1	X4
	p		X2	X5
	N	X	X3	X6
TRAILR2	τ	X1	1,000	X7
	p	X2		X8
	N	X3	X	X9
TRAILR4	τ	X4	X7	1,000
	p	X5	X8	
	N	X6	X9	X

Die Berechnungen wurden jeweils für die 3 zytoplasmatischen und nukleären Scores Intensität, Anzahl positiver Zellen und Summenscore erstellt und ebenfalls für die Addition der beiden Summenscores, den Gesamtscore. Die erhobenen Werte wurden für die Berechnungen nicht dichotomisiert.

In den verschiedenen Färbeserien wurden nicht in allen gefärbten Fällen Tumorzellen identifiziert und in den folgenden Tabellen variiert die Anzahl der untersuchten Fälle N in den Korrelationsanalysen. Mit der Option des paarweisen Fallausschlusses wurden bei den durchgeführten bivariaten Untersuchungen jeweils die Analysen nicht durchgeführt, bei denen einer der zwei beteiligten Fälle einen fehlenden Wert aufwiesen. Die Variable, bei der der entsprechende Wert vorlag, wurde in den Berechnungen mit fehlendem Vergleichspartner nicht berücksichtigt. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass jeweils ein untersuchter Fall hinsichtlich seines Expressionsmusters untersucht wird.

3. Ergebnisse

3.1 Das Alter der histologischen Schnitte beeinflusst das Farbergebnis

Die verwendeten Gewebeschnitte der PDAC-Kohorte lagerten vor den immunhistochemischen Färbungen etwa ein Jahr lang bei 4°Celsius im Institut für experimentelle Tumorforschung des UKSH Campus Kiel. Für die Etablierung der Färbeprotokolle wurden Tissue Micro Arrays und Großschnitte von Pankreaskarzinomen und anderen Geweben genutzt, welche erst kurz vor ihrer Verwendung geschnitten wurden. Obwohl das immunhistochemische Protokoll dieser Etablierungsfärbungen beibehalten wurde, fiel das Farbsignal in den auszuwertenden PDAC-Fällen vergleichsweise schwächer aus. Um diese Auffälligkeit näher zu untersuchen, stellten wir von einem Fall aus der Kohorte frische Schnitte her und färbten diese parallel zu einem länger gelagerten Schnitt dieses Falles. In der Auswertung war ein starker Unterschied in der Farbgebung zu beobachten, so wies der frisch geschnittene Fall in der Quersumme der untersuchten Parameter eine deutlich höhere Immunreaktivität auf. Aus diesem Grunde wurden die Färbungen, welche insgesamt eine unerwartet schwache Farbreaktion aufwiesen (HMGA2, TRAIL-Rezeptor 4 und Ligand TRAIL) erneut geschnitten, gefärbt, ausgewertet und die aktuelleren Ergebnisse statistisch ausgewertet. Im Scoring der Schnitte wurden so durchschnittlich höhere Werte erzielt als in der ersten Färbung. Dies schränkte die ursprünglich geplante Idee ein, serielle Schnitte auszuwerten um die Koexpression der Tumorzellen besser analysieren zu können.

Der Umstand, dass das Alter der Schnitte das immunhistochemische Farbergebnis maßgeblich beeinflussen kann, ist auch in einer Arbeit von Mirlacher et al. beschrieben. Bei 4°Celsius gelagerte 6 Monate alte und frische TMA-Schnitte wurden jeweils parallel mit 5 verschiedenen Antikörpern gefärbt. Bei allen 5 Färbereihen gab es in der mikroskopischen Auswertung höhere Positivraten bei den frisch geschnittenen TMAs (46 vs. 65% ($P<0.0001$), 18.5 vs. 33% ($P<0.0001$), 9.6 vs. 16.3% ($P=0.0047$), 37.7 vs. 45.1% ($P=0.10$) und 32.9 vs. 58.9% ($P<0.0001$)) (Mirlacher et al. 2004).

3.2 TRAIL-Rezeptor 1

3.2.1 TRAIL-R1-Expression in Pankreastumoren

In dem mit dem TRAIL-Rezeptor-1-Antikörper gefärbten Gewebe war keine Hintergrundfärbung zu beobachten. In den Tumorzellen war sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär ein Farbsignal vorhanden.

In der durchgeführten Färbeserie waren 39 Fälle auswertbar. Eine zytoplasmatische Expression von TRAIL-Rezeptor 1 wurde in 84,7% der untersuchten Pankreastumorzellen beobachtet. Dabei wurde die Farbintensität in 41,0 % der Fälle für schwach, in 25,6% der Fälle für mäßig und in 17,9 % der Fälle für stark befunden. In 71,8% wies mehr als die Hälfte der Tumorzellen eine TRAIL-R1-Expression im Zytoplasma auf. Auch die Zellkerne waren hinsichtlich der Farbintensität überwiegend positiv, in 30,8% der Fälle schwach, in 23,0% der Fälle mäßig und in 25,1% der Fälle stark. In 35,9% wurde eine nukleäre Expression in mehr als der Hälfte der Tumorzellen nachgewiesen (siehe Tab.7).

Tab. 7: TRAIL-R1-Expression in den Pankreaskarzinomen

Färbeparameter	Zytoplasma	Zellkern
<u>Farbeintensität</u>		
negativ	6 (15,3%)	10 (25,6%)
schwach positiv	16 (41,0%)	12 (30,8%)
mäßig positiv	10 (25,6%)	9 (23,0%)
stark positiv	7 (17,9%)	8 (25,1%)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0%	6 (15,3%)	10 (25,6%)
<10%	3 (7,7%)	8 (25,1%)
11-50%	2 (5,1%)	7 (17,9%)
51-80%	3 (7,7%)	2 (5,1%)
>80%	25 (64,1%)	12 (30,8%)
<u>Summenscore</u>		
0	6 (20,1%)	10 (25,6%)
1	15 (38,5%)	7 (17,9%)
2	18 (46,2%)	6 (15,3%)
3	-	16 (41,0%)

3.2.2 TRAIL-R1-Expression und Patienten-Überleben

Die erhobenen Befunde der zytoplasmatischen und nukleären Tumorzellparameter wurden mit den Überlebensdaten der Patienten korreliert. Mittels Kaplan-Meier-Analyse wurde das mediane Gesamtüberleben in Monaten samt Standardfehler und Konfidenzintervall ermittelt. Die verschiedenen Färbeparameter wurden dichotomisiert und ihre Beziehung zu den Überlebensdaten untersucht. Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Sämtliche für den TRAIL-Rezeptor 1 erhobenen Parameter wiesen keine signifikante Korrelation mit der Überlebenszeit der Patienten auf (siehe Tab.8).

Tab.8: Patientenüberleben in Abhängigkeit der TRAIL-R1-Expression nach Kaplan-Meier

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt, die TRAIL-R1-Ergebnisse wurden dichotomisiert.

Färbeparameter	Anzahl Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95% KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität</u>			
<u>Zytoplasma</u>			
neg. bis schwach pos.	22	$8 \pm 4,6$ (0,0-17,1)	0,858
mäßig bis stark pos.	17	$12 \pm 2,7$ (6,6-17,4)	
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u>			
<80%	14	$7 \pm 2,8$ (1,5-12,5)	0,567
>80%	25	$12 \pm 3,3$ (5,5-18,5)	
<u>Summenscore</u>			
<u>Zytoplasma</u>			
0-1	21	$9 \pm 5,3$ (0,-19,5)	0,920
2	18	$12 \pm 1,1$ (9,9-14,1)	
<u>Intensität Zellkerne</u>			
neg. bis schwach pos.	22	$7 \pm 2,3$ (2,4-11,6)	0,689
mäßig bis stark pos.	17	$12 \pm 2,1$ (8,0-16,0)	
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u>			
<10%	18	$8 \pm 2,1$ (3,8-12,2)	0,741
>10%	21	$12 \pm 0,8$ (10,5-13,5)	
<u>Summenscore Zellkerne</u>			
0-1	17	$8 \pm 2,7$ (2,6-13,4)	0,732
2-3	22	$12 \pm 2,3$ (7,4-16,6)	

SF: Standardfehler, KI: Konfidenzintervall, neg.: negativ, pos.: positiv

3.3 TRAIL-Rezeptor 2

3.3.1 TRAIL-R2-Expression in Pankreastumoren

In dieser Färbeserie waren 38 Fälle auswertbar. In der Färbung mit dem TRAIL-Rez. 2-Antikörper konnte sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär ein Farbsignal detektiert werden. Abgesehen von einem Fall exprimierten alle Karzinome TRAIL-R2 im Zytoplasma, in 44,7% schwach, in 31,6% mäßig und in 21,1% der Fälle stark. In 89,5% fand sich in mehr als 80% der Tumorzellen der Rezeptor im Zytoplasma. Eine nukleäre Expression von TRAIL-R2 zeigten 86,8% der untersuchten Tumore, wobei diese in jeweils 26,3% der Fälle schwach und mäßig und in 34,2% der Fälle stark positiv war. In 57,9% exprimierten mehr als die Hälfte der Tumorzellkerne TRAIL-R2 (siehe Tab.9).

Tab.9: TRAIL-R2-Expression in den Pankreaskarzinomen

Färbeparameter	Zytoplasma	Zellkern
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	1 (2,6%)	5 (13,2%)
schwach positiv	17 (44,7%)	10 (26,3%)
mäßig positiv	12 (31,6%)	10 (26,3%)
stark positiv	8 (21,1%)	13 (34,2%)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0%	1 (2,6%)	5 (13,2%)
<10%	1 (2,6%)	6 (15,8%)
11-50%	0 (0,0%)	5 (13,2%)
51-80%	2 (5,3%)	6 (15,8%)
>80%	34 (89,5%)	16 (42,1%)
<u>Summenscore</u>		
0	1 (2,6%)	5 (13,2%)
1	14 (36,8%)	4 (10,5%)
2	23 (60,5%)	7 (18,4%)
3	-	22 (57,9%)

3.3.2 TRAIL-R2-Expression und Patienten-Überleben

Sämtliche Färbeparameter der Tumorzellen korrelierten nicht signifikant mit dem medianen Patientenüberleben (siehe Tab.10).

Tab.10: Patientenüberleben in Abhängigkeit der TRAIL-R2-Expression nach Kaplan-Meier

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt, die TRAIL-R2-Ergebnisse wurden dichotomisiert.

Färbeparameter	Anzahl Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95% KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität</u>			
<u>Zytoplasma</u>			
neg. bis schwach pos.	18	9 \pm 5,3 (0,0-19,4)	0,546
mäßig bis stark pos.	20	11 \pm 4,5 (2,2-19,8)	
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u>			
<80%	4	5 \pm 2,1 (0,8-9,2)	0,552
>80%	34	12 \pm 4,4 (3,4-20,6)	
<u>Summenscore</u>			
<u>Zytoplasma</u>			
0-1	15	9 \pm 4,5 (0,2-17,8)	0,503
2	23	12 \pm 5,6 (1,0-23,0)	
<u>Intensität Zellkerne</u>			
neg. bis schwach pos.	15	12 \pm 9,0 (0,0-29,7)	0,304
mäßig bis stark pos.	23	9 \pm 5,6 (0,0-20,0)	
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u>			
<10%	11	7 \pm 3,9 (0,0-14,6)	0,619
>10%	27	12 \pm 3,5 (5,2-18,8)	
<u>Summenscore Zellkerne</u>			
0-1	9	7 \pm 3,0 (1,2-12,9)	0,995
2-3	29	12 \pm 2,7 (6,8-17,2)	

SF: Standardfehler, KI: Konfidenzintervall, neg.: negativ, pos.: positiv

3.4 TRAIL-Rezeptor 4

3.4.1 TRAIL-R4-Expression in Pankreastumoren

In der mit dem TRAIL-Rezeptor-4-Antikörper durchgeführten Färbung ließen sich in 37 Fällen Tumorzellen identifizieren. Das Farbsignal erschien in der mikroskopischen Auswertung vornehmlich negativ oder schwach im Zytoplasma und war im Kern kaum vorhanden. Im übrigen Pankreasgewebe wiesen die Lymphozyten und auch die Erythrozyten teilweise eine starke Immunreaktivität auf. Zudem waren morphologisch unauffällige Inselzellen teilweise kräftig angefärbt.

Hinsichtlich der zytoplasmatischen Farbintensität waren 32,4% der Zellen negativ. Eine Positivität war in 45,9% der Fälle als schwach, in 5,4% der Fälle als mäßig und in 16,2% der Fälle als stark zu bewerten. In 43,2% waren mehr als die Hälfte der Tumorzellen zytoplasmatisch positiv für TRAIL-R4. Eine nukleäre Positivität ließ sich in nur 2 Fällen (5,4%) beobachten, diese war zudem als schwach einzustufen. In den restlichen Tumorzellkernen ließ sich immunhistochemisch kein TRAIL-R4 nachweisen (siehe Tab.11).

Tab.11: TRAIL-R4-Expression in den Pankreaskarzinomen

Färbeparameter	Zytoplasma	Zellkern
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	12 (32,4%)	35 (94,6%)
schwach positiv	17 (45,9%)	2 (5,4%)
mäßig positiv	2 (5,4%)	0 (0,0%)
stark positiv	6 (16,2%)	0 (0,0%)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0%	12 (32,4%)	35 (94,6%)
<10%	2 (5,4%)	2 (5,4%)
11-50%	7 (18,9%)	0 (0,0%)
51-80%	4 (10,8%)	0 (0,0%)
>80%	12 (32,4%)	0 (0,0%)
<u>Summenscore</u>		
0	12 (32,4%)	35 (94,6%)
1	19 (51,3%)	2 (5,4%)
2	6 (16,2%)	0 (0,0%)
3	-	0 (0,0%)

3.4.2 TRAIL-R4-Expression und Patienten-Überleben

Sämtliche Färbeparameter der Tumorzellen korrelierten nicht signifikant mit dem medianen Patientenüberleben (siehe Tab.12). Aufgrund der geringen TRAIL-R4-Expression im Zellkern lassen sich über den Zusammenhang Kernpositivität und Überleben keine näheren Angaben machen.

Tab.12: Patientenüberleben in Abhängigkeit der TRAIL-R4-Expression nach Kaplan-Meier

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt, die TRAIL-R4-Ergebnisse wurden dichotomisiert.

Färbeparameter	Anzahl Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95% KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität Zytoplasma</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos.	29 8	$12 \pm 5,4$ (1,5-22,5) $6 \pm 7,8$ (0,0-21,2)	0,545
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u> <80% >80%	25 12	$12 \pm 5,0$ (2,2-21,8) $6 \pm 6,1$ (0,0-17,9)	0,984
<u>Summenscore Zytoplasma</u> 0-1 2	31 6	$11 \pm 4,5$ (2,3-19,7) $12 \pm 19,0$ (0,0-49,2)	0,809
<u>Intensität Zellkerne</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos.	35 2	$12 \pm 4,1$ (3,9-20,1) $5 \pm 0,0$	0,998
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u> <10% >10%	37 0	$12 \pm 4,2$ (3,7-20,3) -	-
<u>Summenscore Zellkerne</u> 0-1 2-3	37 0	$12 \pm 4,2$ (3,7-20,3) -	-

SF: Standardfehler, KI: Konfidenzintervall, neg.: negativ, pos.: positiv

3.5 HMGA2

3.5.1 HMGA2-Expression in Pankreastumoren

Die Proteine der high mobility group A sind insbesondere in embryonalen Geweben exprimiert und lassen sich nur selten in gesunden adulten Zellen nachweisen. Sie sind in der Lage, DNA zu binden und auf diese Weise den Zellzyklus zu regulieren. Aufgrund ihrer Überexpression in malignen Geweben wird ihnen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und Progression von Tumoren zugeschrieben (Pallante et al. 2015). In 38 der gefärbten Fälle ließen sich Tumorzellen identifizieren und bewerten. Eine HMGA2-Expression war sowohl zytoplasmatisch als auch seltener nukleär vorhanden. Mitangeschnittene gastrointestinale duodenale Krypten waren basal betont angefärbt und auch die sich auf den Schnitten befindlichen Makrophagen waren in dieser Färbung positiv.

Eine zytoplasmatische Immunreaktion war in 65,7% der Fälle zu beobachten. Diese fiel in 44,7% schwach, in 18,4% mäßig und 2,6% der Fälle stark aus. In 39,5% waren mehr als die Hälfte der Tumorzellen zytoplasmatisch positiv für HMGA2. Ein nukleärer Nachweis fand sich lediglich in 18,4% der Zellen, wobei dieser in 2,6% schwach, in 5,3% mäßig und in 10,5% stark positiv war. Nur in 2 Fällen (5,3%) waren mehr als 50% der Zellkerne angefärbt (siehe Tab.13).

Tab.13: HMGA2-Expression in den Pankreaskarzinomen

Färbeparameter	Zytoplasma	Zellkern
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	13 (34,2%)	31 (81,6%)
schwach positiv	17 (44,7%)	1 (2,6%)
mäßig positiv	7 (18,4%)	2 (5,3%)
stark positiv	1 (2,6%)	4 (10,5%)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0%	13 (34,2%)	31 (81,6%)
<10%	2 (5,3%)	3 (7,9%)
11-50%	8 (21,1%)	2 (5,3%)
51-80%	6 (15,8%)	2 (5,3%)
>80%	9 (23,7%)	0 (0,0%)
<u>Summenscore</u>		
0	13 (34,2%)	31 (81,6%)
1	19 (50,0%)	2 (5,3%)
2	6 (15,8%)	1 (2,6%)
3	-	4 (10,5%)

3.5.2 HMGA2-Expression und Patienten-Überleben

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen HMGA2-Expression in der Tumorzelle und medianem Patientenüberleben festgestellt werden (siehe Tab.14).

Tab.14: Patientenüberleben in Abhängigkeit der HMGA2-Expression nach Kaplan-Meier

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt, die HMGA2-Ergebnisse wurden dichotomisiert.

Färbeparameter	Anzahl Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95% KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität Zytoplasma</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos.	30 8	$7 \pm 2,7$ (1,6-12,4) $34 \pm 10,6$ (13,2-54,8)	0,207
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u> <80% >80%	29 9	$11 \pm 4,4$ (2,2-19,8) $12 \pm 6,0$ (0,3-23,7)	0,964
<u>Summenscore Zytoplasma</u> 0-1 2	32 6	$8 \pm 3,5$ (1,1-14,9) $23 \pm 13,5$ (0,0-49,4)	0,445
<u>Intensität Zellkerne</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos.	31 7	$9 \pm 3,3$ (2,5-15,5) $34 \pm 28,8$ (0,0-90,5)	0,365
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u> <10% >10%	34 4	$9 \pm 2,9$ (3,3-14,7) $34 \pm 19,0$ (0,0-71,2)	0,276
<u>Summenscore Zellkerne</u> 0-1 2-3	33 5	$9 \pm 3,4$ (2,2-15,8) $34 \pm 24,1$ (0,0-81,2)	0,350

SF: Standardfehler, KI: Konfidenzintervall, neg.: negativ, pos.: positiv

3.6 TRAIL-Ligand

3.6.1 TRAIL-Ligand-Expression in Pankreastumoren

In 37 Fällen konnten Tumorzellen auf den Schnitten identifiziert und die Gewebe entsprechend ausgewertet werden. Die Immunreaktion fand sich zytoplasmatisch besonders perinukleär betont. Seltener war es auch im Zellkern vorhanden. Auffällig war das nach luminal hin verstärkte Farbsignal in den Zellen. Desweiteren waren Endothel und morphologisch unauffällige Inselzellen positiv. Ferner ließ sich eine Anfärbung des Stromas beobachten. Die Nervenzellen der Präparate waren stark positiv gefärbt und dienten somit als interne Positivkontrolle.

91,9% der Tumorzellen exprimierten den TRAIL-Ligand im Zytoplasma, 43,2% schwach und jeweils 24,3% mäßig und stark. In 72,9% waren mehr als die Hälfte der Tumorzellen zytoplasmatisch positiv. Eine nukleäre Expression fand sich in nur 27% der Fälle, davon 10,8% schwach und jeweils 8,1% mäßig und stark. In nur 3 Fällen (8,1%) waren mehr als 50% der Tumorzellkerne positiv für den TRAIL-Ligand (siehe Tab.15).

Tab.15: TRAIL-Ligand-Expression in den Pankreaskarzinomen

Färbeparameter	Zytoplasma	Zellkern
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	3 (8,1%)	27 (73,0%)
schwach positiv	16 (43,2%)	4 (10,8%)
mäßig positiv	9 (24,3%)	3 (8,1%)
stark positiv	9 (24,3%)	3 (8,1%)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0%	3 (8,1%)	27 (73,0%)
<10%	5 (13,5%)	5 (13,5%)
11-50%	2 (5,4%)	2 (5,4%)
51-80%	4 (10,8%)	3 (8,1%)
>80%	23 (62,1%)	0 (0,0%)
<u>Summenscore</u>		
0	3 (8,1%)	27 (73,0%)
1	16 (43,2%)	3 (8,1%)
2	18 (48,6%)	4 (10,8%)
3	-	3 (8,1%)

3.6.2 TRAIL-Ligand-Expression und Patienten-Überleben

Sämtliche Färbeparameter der Tumorzellen für den TRAIL-Ligand korrelierten nicht signifikant mit dem medianen Patientenüberleben (siehe Tab.16).

Tab.16: Patientenüberleben in Abhängigkeit der TRAIL-Ligand-Expression nach Kaplan-Meier

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt, die TRAIL-Ligand-Ergebnisse wurden dichotomisiert.

Färbeparameter	Anzahl Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95% KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität Zytoplasma</u>			
neg. bis schwach pos.	19	$8 \pm 2,9$ (2,3-13,7)	0,638
mäßig bis stark pos.	18	$12 \pm 7,1$ (0,0-25,9)	
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u>			
<80%	14	$7 \pm 3,7$ (0,0-14,3)	0,177
>80%	23	$12 \pm 8,0$ (0,0-27,7)	
<u>Summenscore Zytoplasma</u>			
0-1	19	$8 \pm 2,9$ (2,3-13,7)	0,638
2	18	$12 \pm 7,071$ (0,0-25,9)	
<u>Intensität Zellkerne</u>			
neg. bis schwach pos.	27	$12 \pm 2,6$ (7,0-17,1)	0,671
mäßig bis stark pos.	10	$6 \pm 14,2$ (0,0-33,9)	
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u>			
<10%	32	$12 \pm 4,2$ (3,7-20,3)	0,915
>10%	5	$6 \pm 4,4$ (0,0-14,6)	
<u>Summenscore Zellkerne</u>			
0-1	30	$11 \pm 2,7$ (5,6-16,4)	0,985
2-3	7	$23 \pm 22,3$ (0,0-66,6)	

SF: Standardfehler, KI: Konfidenzintervall, neg.: negativ, pos.: positiv

3.7 CD95

3.7.1 CD95-Expression in Pankreastumoren

38 Fälle der Pankreasgewebe wiesen Tumorzellen auf und konnten ausgewertet werden. Zytoplasmatisch erschien das Farbsignal nicht homogen verteilt, sondern vielmehr granuliert. Es ließ sich auch eine nukleäre Expression von CD95 beobachten. Die Granulozyten im Pankreasgewebe waren ebenfalls positiv und dienten somit als interne Positivkontrolle.

Alle untersuchten Pankreastumoren exprimierten CD95 im Zytoplasma. In 13,2% war die Expression schwach, in 23,7% mäßig und in 63,2% stark ausgeprägt. In 94,7% waren mehr als 80% der Tumorzellen zytoplasmatisch positiv. Eine nukleäre Expression fand sich etwas seltener, so wiesen 57,9% der Zellkerne eine Positivität für CD95 auf, in 7,9% schwach, in

39,5% mäßig und in 10,5% der Fälle stark. In nur 13,2% fand sich in mehr als der Hälfte der Tumorzellkerne eine Expression des Rezeptors (siehe Tab.17).

Tab.17: CD95-Expression in den Pankreaskarzinomen

Färbeparameter	Zytoplasma	Zellkern
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	0 (0,0%)	16 (42,1%)
schwach positiv	5 (13,2%)	3 (7,9%)
mäßig positiv	9 (23,7%)	15 (39,5%)
stark positiv	24 (63,2%)	4 (10,5%)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0%	0 (0,0%)	16 (42,1%)
<10%	0 (0,0%)	10 (26,3%)
11-50%	1 (2,6%)	7 (18,4%)
51-80%	1 (2,6%)	5 (13,2%)
>80%	36 (94,7%)	0 (0,0%)
<u>Summenscore</u>		
0	0 (0,0%)	16 (42,1%)
1	6 (15,8%)	9 (23,7%)
2	32 (84,2%)	6 (15,8%)
3	-	7 (18,4%)

3.7.2 CD95- Expression und Patienten-Überleben

Die Anzahl der positiven Zellkerne und der Summenscore für die Zellkerne korrelierten nicht signifikant mit dem medianen Patientenüberleben. Alle erhobenen zytoplasmatischen Werte, sowie die Farbintensität der Zellkerne ergaben hingegen ein signifikantes Ergebnis hinsichtlich der Überlebenszeit (siehe Tab.18). Hinsichtlich der zytoplasmatischen Intensität wiesen Patienten mit einem negativen oder schwachen Score ein mit 4 Monaten signifikant kürzeres medianes Überleben auf, als solche, mit einer mäßigen bis starken Expression, welches mit einem 15-monatigem medianen Überleben einhergeht. Ähnliches gilt für die Anzahl der zytoplasmatisch positiven Zellen. Bei einer geringen Anzahl beträgt der Mittelwert für das Überleben 2,5 Monate, der Median bei einer über 80%igen CD95-Expression ist hingegen auf 12 Monate verlängert. Dementsprechend verhält es sich mit dem zytoplasmatischen Summenscore, bei einem niedrigen Score von 0 und 1 überlebten die Patienten im Median 2 Monate, bei einem hohen Score von 2 durchschnittlich 15 Monate. Auch die Intensität der CD95-Expression im Zellkern weist einen signifikanten Zusammenhang mit den Patientenüberleben bei einer, im Gegensatz zu den zytoplasmatischen Werten, ausgewogenen Fallzahl auf. Bei einer negativen und schwachen nukleären Expression des Rezeptors überleben die Patienten im Median 4 Monate, wohingegen die

mediane Überlebenszeit bei einer mäßigen bis starken Expression 21 Monate beträgt (siehe Abb.2).

Tab.18: Patientenüberleben in Abhängigkeit der CD95-Expression nach Kaplan-Meier

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt, die CD95-Ergebnisse wurden dichotomisiert.

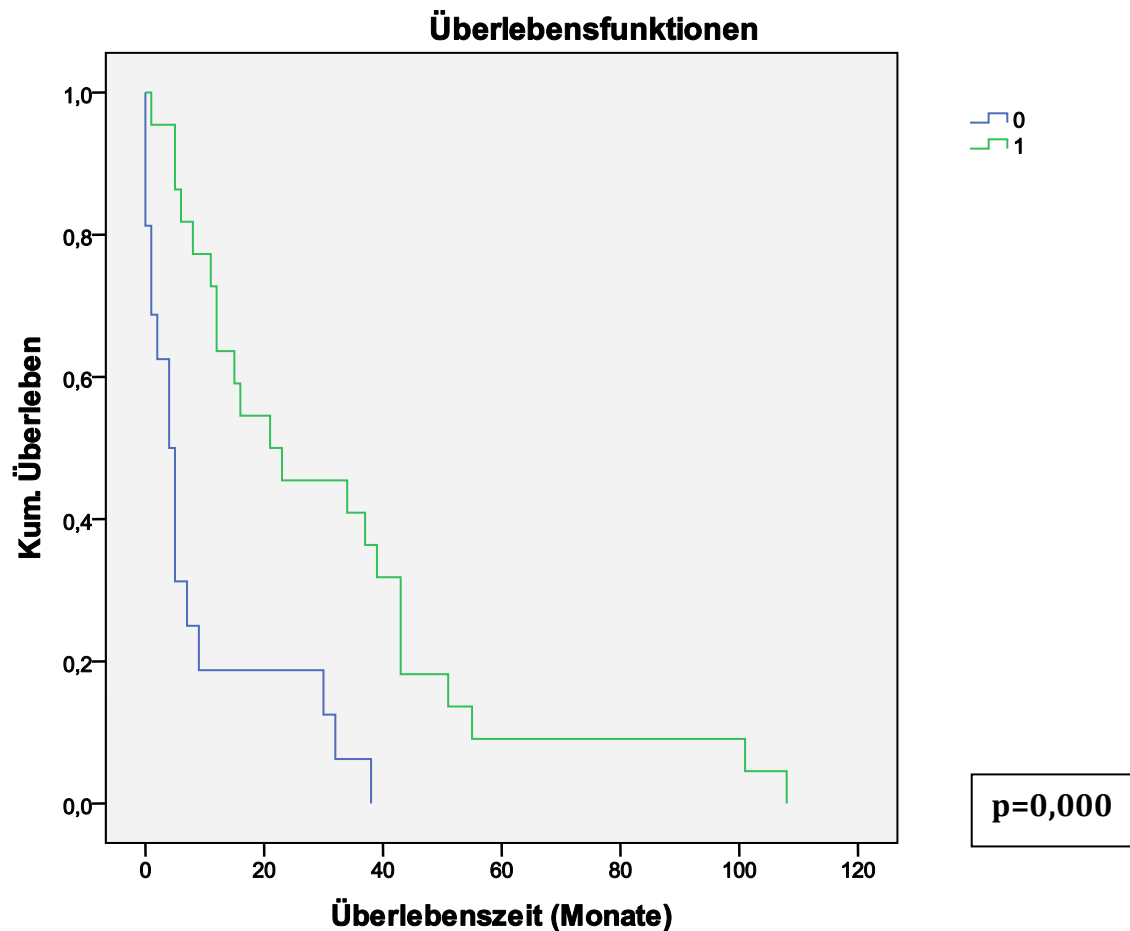
Färbeparameter	Anzahl Patienten	Medianes Gesamtüberleben ± SF (95% KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität Zytoplasma</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos.	5 33	4±4,4 (0,0-12,6) 15±5,7 (3,7-26,2)	0,001
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u> <80% >80%	2 36	Mittelwert: 2,5±2,5 (0,0-7,40) 12±4,5 (3,2-20,8)	0,027
<u>Summenscore Zytoplasma</u> 0-1 2	6 32	2±2,4 (0,0-6,8) 15±5,7 (3,9-26,1)	<0,0001
<u>Intensität Zellkerne</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos.	16 22	4±1,2 (1,6-6,4) 21±11,1 (0,0-42,8)	<0,0001
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u> <10% >10%	26 12	6±1,8 (2,4-9,6) 15±7,8 (0,0-30,3)	0,349
<u>Summenscore Zellkerne</u> 0-1 2-3	25 13	6±1,2 (3,6-8,4) 21±13,2 (0,0-46,8)	0,097

SF: Standardfehler, KI: Konfidenzintervall, neg.: negativ, pos.: positiv

Abb. 2: Kaplan-Meier-Analyse des kumulativen Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der nukleären Intensität der CD95-Expression.

Die zugehörige Signifikanz (p) wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Die Ergebnisse wurden dichotomisiert: 0=negativ bis schwach positiv, 1=mäßig bis stark positiv



3.8 TNF-Rezeptor 1

3.8.1 TNFR1-Expression in Pankreastumoren

Bei der mit dem Anti-TNF-Rezeptor-Antikörper durchgeführten Färbeserie wurden in 38 Fällen Tumorzellen auf den Gewebeschnitten identifiziert. Das Farbsignal war sowohl zytoplasmatisch als auch in wenigen Fällen nukleär vorhanden. Weitere Immunreaktionen fanden sich in Makrophagen und pankreatischen Inselzellen. Zudem ließ sich eine geringe Hintergrundfärbung beobachten.

Mit 89,5% waren die meisten Tumorzellen zytoplasmatisch positiv für den TNF-Rezeptor. In 28,9% war das Farbsignal schwach, in 21,1% mäßig und in 39,5% der Fälle stark vorhanden. In 71,1% waren über die Hälfte der Tumorzellen zytoplasmatisch positiv. Eine nukleäre Expression zeigte sich deutlich seltener in nur 13,2% der Fälle, davon in jeweils einem Fall (2,6%) schwach und mäßig und in 7,9% stark. Bei einer positiven nukleären

Reaktion waren stets jedoch weniger als 10% der begutachteten Tumorzellkerne angefärbt (siehe Tab.19).

Tab.19: TNFR1-Expression in den Pankreaskarzinomen

Färbeparameter	Zytoplasma	Zellkern
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	4 (10,5%)	33 (86,8%)
schwach positiv	11 (28,9%)	1 (2,6%)
mäßig positiv	8 (21,1%)	1 (2,6%)
stark positiv	15 (39,5%)	3 (7,9%)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0%	4 (10,5%)	33 (86,8%)
<10%	5 (13,2%)	5 (13,2%)
11-50%	2 (5,3%)	0 (0,0%)
51-80%	9 (23,7%)	0 (0,0%)
>80%	18 (47,4%)	0 (0,0%)
<u>Summenscore</u>		
0	4 (10,5%)	33 (86,8%)
1	13 (34,2%)	3 (7,9%)
2	21 (55,3%)	2 (5,3%)
3	-	0 (0,0%)

3.8.2 TNF-Rezeptor 1-Expression und Patienten-Überleben

Sämtliche erhobene Parameter für den Tumorzellkern korrelierten nicht signifikant mit dem medianen Patientenüberleben und ergaben nach Kaplan-Meier-Testung aufgrund ihrer überwiegenden Negativität kein differenziertes Ergebnis. Während die zytoplasmatischen Werte für die Anzahl der positiven Zellen und den Summenscore knapp außerhalb des Signifikanzbereiches liegen, ergab die Betrachtung der zytoplasmatischen Farbintensität einen signifikanten Zusammenhang zu dem Patientenüberleben (siehe Tab.20). Eine negative und schwache Expression ging mit einem kurzen medianen Überleben von 5 Monaten einher, wohingegen eine mäßige und starke Intensität mit einem Patientenüberleben von 21 Monaten vergesellschaftet war (siehe Abb.3).

Tab.20: Patientenüberleben in Abhängigkeit der TNF-Rezeptor 1-Expression nach Kaplan-Meier

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt, die TNFR-Ergebnisse wurden dichotomisiert.

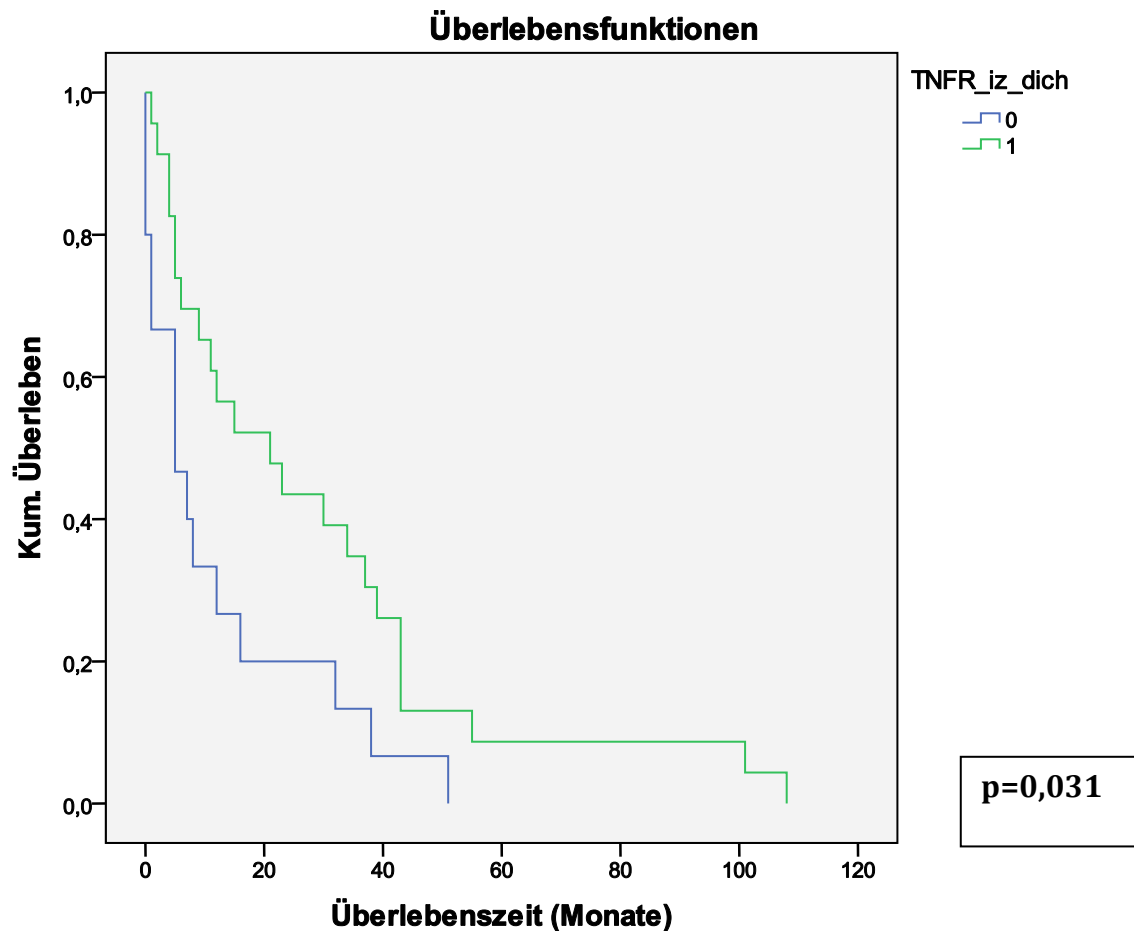
Färbeparameter	Anzahl Patienten	Medianes Gesamtüberleben ± SF (95% KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität Zytoplasma</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos.	15 23	5±2,9 (0,0-10,7) 21±8,8 (3,8-38,2)	0,031
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u> <80% >80%	20 18	9±5,6 (0,0-20,0) 11±4,2 (2,7-19,3)	0,094
<u>Summenscore Zytoplasma</u> 0-1 2	17 21	7±2,9 (1,4-12,6) 21±8,4 (4,6-37,4)	0,077
<u>Intensität Zellkerne</u> neg. bis schwach pos. mäßig bis stark pos.	33 5	11±2,9 (5,4-16,6) 15±11,0 (0,0-36,5)	0,793
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u> <10% >10%	38 0	11±3,1 (5,0-17,0) -	-
<u>Summenscore Zellkerne</u> 0-1 2-3	36 2	11±3,0 (5,1-16,9) 2±0,0 (-)	0,863

SF: Standardfehler, KI: Konfidenzintervall, neg.: negativ, pos.: positiv

Abb.3: Kaplan-Meier-Analyse des kumulativen Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der zytoplasmatischen Intensität der TNFR-Expression.

Die zugehörige Signifikanz (p) wurde mittels Log-Rank-Test ermittelt.

Die Ergebnisse wurden dichotomisiert: 0=negativ bis schwach positiv, 1=mäßig bis stark positiv



3.9 TNF-Ligand

3.9.1 TNF-Ligand-Expression in Pankreastumoren

Eine Identifikation der Tumorzellen in der Färbeserie mit dem TNF-Ligand-Antikörper gelang in 36 Fällen. Dabei war das Farbsignal teilweise im Zytoplasma, jedoch nicht im Kern vorhanden. In positiven Zellen konnte man eine luminale Betonung der Anfärbung beobachten. Begleitend fand sich in den Präparaten eine starke Stromafärbung.

Ein zytoplasmatischer Nachweis des Liganden fand sich in 44,4%. In 16,7% war die Anfärbung schwach und in 27,8% mäßig ausgeprägt. Nur in 4 Fällen (11,1%) waren über 50% der Tumorzellen zytoplasmatisch positiv. Bei der Betrachtung der Zellkerne ließ sich in keinem Fall ein nukleärer Nachweis des TNF-Liganden beobachten (siehe Tab.21).

Tab.21: TNFL-Expression in den Pankreaskarzinomen

Färbeparameter	Zytoplasma	Zellkern
<u>Färbeintensität</u>		
negativ	20 (55,6%)	36 (100,0%)
schwach positiv	6 (16,7%)	0 (0,0%)
mäßig positiv	10 (27,8%)	0 (0,0%)
stark positiv	0 (0,0%)	0 (0,0%)
<u>Anzahl positiver Zellen</u>		
0%	20 (55,6%)	36 (100,0%)
<10%	5 (13,9%)	0 (0,0%)
11-50%	7 (19,4%)	0 (0,0%)
51-80%	3 (8,3%)	0 (0,0%)
>80%	1 (2,8%)	0 (0,0%)
<u>Summenscore</u>		
0	20 (55,6%)	36 (100,0%)
1	13 (36,1%)	0 (0,0%)
2	3 (8,3%)	0 (0,0%)
3	-	0 (0,0%)

3.9.2 TNF-Ligand-Expression und Patienten-Überleben

Die zytoplasmatischen Färbeparameter der Tumorzellen für den TNF-Ligand korrelierten nicht signifikant mit dem medianen Patientenüberleben. Aufgrund der nukleären Negativität für den Liganden ließen sich hinsichtlich der Kernparameter keine Korrelationsberechnungen durchführen (siehe Tab.22).

Tab.22: Patientenüberleben in Abhängigkeit der TNF-Ligand-Expression nach Kaplan-Meier

Die zugehörigen p-Werte wurden mittels Log-Rank-Test ermittelt, die TNF-Ligand-Ergebnisse wurden dichotomisiert.

Färbeparameter	Anzahl Patienten	Medianes Gesamtüberleben \pm SF (95% KI) in Monaten	p-Wert
<u>Färbeintensität</u>			
<u>Zytoplasma</u>			
neg. bis schwach pos.	26	9 \pm 3,2 (2,8-15,2)	0,806
mäßig bis stark pos.	10	12 \pm 13,4 (0,0-38,3)	
<u>Anzahl Zellen mit pos. Zytoplasma</u>			
<80%	35	11 \pm 3,0 (5,2-16,8)	0,769
>80%	1	37 \pm (nur 1 Fall vorhanden)	
<u>Summenscore</u>			
<u>Zytoplasma</u>			
0-1	33	11 \pm 2,9 (5,4-16,6)	0,659
2	3	37 \pm 25,3 (0,0-86,6)	
<u>Intensität Zellkerne</u>			
neg. bis schwach pos.	36	11 \pm 3,0 (5,1-16,9)	-
mäßig bis stark pos.	0	-	
<u>Anzahl pos. Zellkerne</u>			
<10%	36	11 \pm 3,0 (5,1-16,9)	-
>10%	0	-	
<u>Summenscore Zellkerne</u>			
0-1	36	11 \pm 3,0 (5,1-16,9)	-
2-3	0	-	

SF: Standardfehler, KI: Konfidenzintervall, neg.: negativ, pos.: positiv

3.10 Koexpression von Rezeptor und Ligand im duktalem Pankreasadenokarzinom

3.10.1 Intensität Zytoplasmafärbung:

Bezüglich der zytoplasmatischen Intensität wurde ein hoch signifikanter Zusammenhang ($p=0,003$) zwischen der Expression des TNF-Rezeptors und seines TNF-Liganden beobachtet. Bei der Koexpression von HMGA2 und dem TRAIL-Rezeptor 4 findet sich ein p-Wert von 0,013. Ebenfalls signifikant ist die Expression TNF-R1 und HMGA2 ($p=0,044$) (siehe Tab.23).

Tab. 23: Korrelation der untersuchten Antigene untereinander bezüglich der Intensität des Zytoplasmas.
Die Werte wurden mit dem Korrelationskoeffizienten Kendall τ erhoben.

	TRAILR1	TRAILR2	TRAILR4	HMGA2	TRAIL-L	CD95	TNFR1	TNFL
τ		,232	-,058	-,227	,094	-,028	,258	,057
TRAILR1 p		,110	,691	,117	,514	,848	,070	,703
N		37	36	37	36	37	37	35
τ			-,155	-,147	,147	,154	,016	,137
TRAILR2 p			,312	,326	,330	,315	,914	,383
N			35	36	35	36	36	34
τ				,368*	,150	-,089	,191	,060
TRAILR4 p				,013	,309	,557	,189	,696
N				37	36	37	37	35
τ					,135	-,033	,289*	,214
HMGA2 p					,354	,824	,044	,160
N					37	38	38	36
τ						,263	,243	,273
TRAIL-Ligand p						,078	,089	,073
N						37	37	35
τ							,141	,070
CD95 p							,336	,654
N							38	36
τ								,439**
TNFR1 p								,003
N								36
τ								
TNFL p								
N								

τ : Rangkorrelationskoeffizient Kendall τ ; p: Signifikanzwert p; N: Anzahl der untersuchten Fälle

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

3.10.2 Anzahl der Tumorzellen mit positivem Zytoplasma:

Betrachtet man die prozentuale Anzahl der zytoplasmatisch positiven Zellen, finden sich mehrere hochsignifikante Zusammenhänge: eine Koexpression von TNF-Rezeptor 1 und TNF-Ligand ($p=0,001$), TNF-Rezeptor 1 und TRAIL-Ligand ($p=0,003$), sowie TNF-R1 und HMGA2 ($p=0,008$). HMGA2 findet sich zudem ähnlich häufig wie TRAIL-Rezeptor 4

($p=0,003$). Eine signifikante Korrelation gibt es zwischen dem CD95-Rezeptor und dem TRAIL-Liganden ($p=0,045$) (siehe Tab.24).

Tab. 24: Korrelation der untersuchten Antigene untereinander bezüglich der Anzahl der Tumorzellen mit positivem Zytoplasma. Die Werte wurden mit dem Korrelationskoeffizienten Kendall τ erhoben.

		TRAILR1	TRAILR2	TRAILR4	HMGA2	TRAIL-L	CD95	TNFR1	TNFL
TRAILR1	τ		,244	,056	,007	,265	,096	,280	,098
	p		,114	,703	,963	,074	,536	,053	,511
	N		37	36	37	36	37	37	35
TRAILR2	τ			,175	,289	-,009	,282	,082	,000
	p			,259	,055	,953	,088	,592	1,000
	N			35	36	35	36	36	34
TRAILR4	τ				,415**	,157	,005	,174	-,017
	p				,003	,277	,972	,218	,909
	N				37	36	37	37	35
HMGA2	τ					,071	,130	,367**	,219
	p					,616	,379	,008	,128
	N					37	38	38	36
TRAIL-Ligand	τ						,311*	,433**	,193
	p						,045	,003	,200
	N						37	37	35
CD95	τ							,263	,191
	p							,081	,222
	N							38	36
TNFR1	τ								,497**
	p								,001
	N								36
TNFL	τ								
	p								
	N								

τ : Rangkorrelationskoeffizient Kendall τ ; p: Signifikanzwert p; N: Anzahl der untersuchten Fälle

*, Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

**, Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

3.10.3 Errechneter Score Zytoplasma:

Addiert man die Werte für die Intensität der zytoplasmatischen Färbung und der prozentualen Anzahl der in diesem Bereich positiven Tumorzellen erhält man den Zytoplasma-Score.

Hochsignifikante Korrelationen für diesen Parameter finden sich sowohl zwischen TNF-Rezeptor 1 und TNF-Ligand ($p=0,001$), als auch zwischen TNF-Rezeptor 1 und TRAIL-Ligand ($p=0,003$). Der TNF-Rezeptor 1 und HMGA2 korrelieren signifikant miteinander ($p=0,013$). Es fand sich auch ein Zusammenhang für die Expression von dem CD95-Rezeptor und TRAIL-Rezeptor 2 ($p=0,021$), sowie gleichermaßen für den TRAIL-Rezeptor 4 und HMGA2 ($p=0,011$) (siehe Tab.25).

Tab. 25: Korrelation der untersuchten Antigene untereinander bezüglich des zytoplasmatischen Summenscores. Die Werte wurden mit dem Korrelationskoeffizienten Kendall τ erhoben.

	TRAILR1	TRAILR2	TRAILR4	HMGA2	TRAIL-L	CD95	TNFR1	TNFL
TRAILR1 τ		,209	,020	-,186	,098	-,025	,231	,069
p		,183	,896	,220	,529	,875	,135	,663
N		37	36	37	36	37	37	35
TRAILR2 τ			-,111	,061	,174	,411*	,218	,282
p			,500	,702	,287	,014	,174	,093
N			35	36	35	36	36	34
TRAILR4 τ				,384*	,266	,124	,284	,098
p				,011	,090	,434	,065	,536
N				37	36	37	37	35
HMGA2 τ					,173	,100	,378*	,232
p					,262	,524	,013	,138
N					37	38	38	36
TRAIL-Ligand τ						,208	,463**	,277
p						,198	,003	,085
N						37	37	35
CD95 τ							,243	,248
p							,126	,130
N							38	36
TNFR1 τ								,545**
p								,001
N								36
TNFL τ								
p								
N								

τ : Rangkorrelationskoeffizient Kendall τ ; p: Signifikanzwert p; N: Anzahl der untersuchten Fälle

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

3.10.4 Intensität Kernfärbung:

Bezüglich der Stärke der nukleären Anfärbung finden sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen HMGA2 und dem TRAIL-Rezeptor 2 ($p=0,022$). Positiv signifikant korrelierten der TNF-Rezeptor 1 und der TRAIL-Ligand ($p=0,017$) miteinander, ebenso der CD95-Rezeptor und HMGA2 ($p=0,036$) (siehe Tab.26).

Tab. 26: Korrelation der untersuchten Antigene untereinander bezüglich der Intensität der Kernfärbung.
Die Werte wurden mit dem Korrelationskoeffizienten Kendall τ erhoben.

		TRAILR1	TRAILR2	TRAILR4	HMGA2	TRAIL -L	CD95	TNFR1	TNFL
TRAILR1	τ		,034	,232	-,127	,165	,117	,007	.
	p		,809	,133	,391	,265	,413	,963	.
	N		37	36	37	36	37	37	35
TRAILR2	τ			-,088	-,346*	,126	-,114	,090	.
	p			,578	,022	,405	,434	,553	.
	N			35	36	35	36	36	34
TRAILR4	τ				,208	,071	,057	,213	.
	p				,201	,661	,718	,193	.
	N				37	36	37	37	35
HMGA2	τ					-,042	,316*	,176	.
	p					,786	,036	,264	.
	N					37	38	38	36
TRAIL- Ligand	τ						,003	,373*	.
	p						,986	,017	.
	N						37	37	35
CD95	τ							,056	.
	p							,711	.
	N							38	36
TNFR1	τ								.
	p								.
	N								36
TNFL	τ								
	p								
	N								

τ : Rangkorrelationskoeffizient Kendall τ ; p: Signifikanzwert p; N: Anzahl der untersuchten Fälle

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

3.10.5 Anzahl Tumorzellen mit positivem Kern:

Betrachtet man die prozentuale Anzahl der positiven Tumorzellkerne korrelieren der TNF-Rezeptor 1 und der TRAIL-Ligand hochsignifikant miteinander ($p=0,002$). Ein signifikantes Ergebnis erhält man für den CD95-Rezeptor und HMGA2 ($p=0,016$) und für den TRAIL-Rezeptor 1 und 2 ($p=0,023$). Ein negativer signifikanter Zusammenhang findet sich zwischen HMGA2 und dem TRAIL-Rezeptor 2 ($p=0,020$). (siehe Tab.27).

Tab. 27: Korrelation der untersuchten Antigene untereinander bezüglich der Anzahl der positiven Tumorzellkerne. Die Werte wurden mit dem Korrelationskoeffizienten Kendall τ erhoben.

		TRAILR1	TRAILR2	TRAILR4	HMGA2	TRAIL-L	CD95	TNFR1	TNFL
TRAILR1	τ		,313*	,201	-,183	,264	,191	,038	.
	p		,023	,188	,211	,073	,172	,801	.
	N		37	36	37	36	37	37	35
TRAILR2	τ			-,076	-,345*	,009	-,196	,000	.
	p			,628	,020	,954	,168	1,000	.
	N			35	36	35	36	36	34
TRAILR4	τ				,223	,078	,033	,255	.
	p				,169	,630	,832	,126	.
	N				37	36	37	37	35
HMGA2	τ					,023	,355*	,214	.
	p					,882	,016	,180	.
	N					37	38	38	36
TRAIL-Ligand	τ						,044	,497**	.
	p						,763	,002	.
	N						37	37	35
CD95	τ							,138	.
	p							,362	.
	N							38	36
TNFR1	τ								.
	p								.
	N								36

τ : Rangkorrelationskoeffizient Kendall τ ; p: Signifikanzwert p; N: Anzahl der untersuchten Fälle

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

3.10.6 Errechneter Score Kern:

Der Kernscore setzt sich zusammen aus der Addition der Werte für die Intensität der nukleären Färbung und der Anzahl der positiven Tumorzellkerne. Positiv hochsignifikant ist das gleichzeitige Vorkommen von TNF-Rezeptor 1 und dem TRAIL-Liganden ($p=0,005$). In negativer Weise signifikant korrelieren der TRAIL-Rezeptor 2 und HMGA2 miteinander ($p=0,040$). Einen signifikanten positiven Zusammenhang gibt es zwischen dem CD95-Rezeptor und HMGA2 ($p=0,012$), sowie TRAIL-Rezeptor 1 und 2 ($p=0,033$) (siehe Tab.28).

Tab. 28: Korrelation der untersuchten Antigene untereinander bezüglich des Kernscores. Die Werte wurden mit dem Korrelationskoeffizienten Kendall τ erhoben.

		TRAILR1	TRAILR2	TRAILR4	HMGA2	TRAIL-L	CD95	TNFR1	TNFL
TRAILR1	τ		,307*	,238	-,061	,216	,160	,021	.
	p		,033	,127	,685	,148	,258	,889	.
	N		37	36	37	36	37	37	35
TRAILR2	τ			,007	-,317*	,151	-,248	,104	.
	p			,968	,040	,329	,091	,506	.
	N			35	36	35	36	36	34
TRAILR4	τ				,208	,064	,022	,232	.
	p				,201	,693	,888	,157	.
	N				37	36	37	37	35
HMGA2	τ					-,023	,373*	,196	.
	p					,882	,012	,214	.
	N					37	38	38	36
TRAIL-Ligand	τ						,000	,446**	.
	p						1,000	,005	.
	N						37	37	35
CD95	τ							,112	.
	p							,454	.
	N							38	36
TNFR1	τ								.
	p								.
	N								36

τ : Rangkorrelationskoeffizient Kendall τ ; p: Signifikanzwert p; N: Anzahl der untersuchten Fälle

*. Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

**. Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)

3.10.7 Intrazellulärer Gesamtscore Tumorzellen:

Der Gesamtscore wird durch eine Addition der Summenscores für das Zytoplasma und den Kern der Adenokarzinomzellen gebildet. Die Expression von TNF-Rezeptor 1 geht hochsignifikant mit dem Vorhandensein von TRAIL-Ligand ($p=0,001$) und dem CD95-Rezeptor einher ($p=0,003$). Auch bei der Expression von TRAIL-Rezeptor 4 und HMGA2 findet hochsignifikanter Zusammenhang ($p=0,005$). Signifikant korrelieren TNF-Rezeptor 1 und sein TNF-Ligand ($p=0,016$), TNF-Rezeptor 1 und HMGA2 ($p=0,025$), CD95-Rezeptor und HMGA2 ($p=0,029$) und TRAIL-Rezeptor 4 und TRAIL-Ligand ($p=0,041$) miteinander (siehe Tab.29).

Tab. 29: Korrelation der untersuchten Antigene untereinander bezüglich des Gesamtscores. Die Werte wurden mit dem Korrelationskoeffizienten Kendall τ erhoben.

		TRAILR1	TRAILR2	TRAILR4	HMGA2	TRAIL-Ligand	CD95	TNFR1	TNFL
TRAILR1	τ		,179	,150	-,098	,169	,155	,249	,221
	p		,188	,295	,482	,219	,244	,072	,135
	N		37	36	37	36	37	37	35
TRAILR2	τ			-,067	-,041	-,110	-,071	,015	,107
	p			,656	,779	,443	,608	,915	,489
	N			35	36	35	36	36	34
TRAILR4	τ				,420**	,299*	,083	,270	,066
	p				,005	,041	,558	,068	,675
	N				37	36	37	37	35
HMGA2	τ					,127	,302*	,322*	,187
	p					,371	,029	,025	,222
	N					37	38	38	36
TRAIL-Ligand	τ						,257	,484**	,266
	p						,059	,001	,078
	N						37	37	35
CD95	τ							,414**	,244
	p							,003	,096
	N							38	36
TNFR1	τ								,366*
	p								,016
	N								36

4 Diskussion

4.1 Das Pankreaskarzinom

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas geht mit einer sehr schlechten Prognose für die betroffenen Patienten einher. Die Analyse der daran beteiligten zellulären Komponenten ist sinnvoll, um das begrenzte Repertoire an therapeutischen Möglichkeiten und die Prognose der erkrankten Patienten zu verbessern. Die Todesrezeptorsysteme CD95, TNF und TRAIL sollen hier vergleichend hinsichtlich ihrer Expression in pankreatischen Adenokarzinomzellen untersucht werden. Analysiert wurden die Zusammenhänge zwischen Expressionsmuster und Überlebensraten. Dabei wurde sowohl die subzelluläre Verteilung der Rezeptoren und Liganden berücksichtigt, als auch das gesamte intrazelluläre Antigenvorkommen, da davon auszugehen ist, dass ein Austausch von Rezeptoren und Liganden zwischen Kern und Zytoplasma, dem „Reservoir“ der Zelle, stattfindet (Bertsch et al. 2014). Zusätzlich wurde die Koexpression der untersuchten Antigene untereinander in den untersuchten Fällen analysiert. Die Zahl von 41 Fällen dient für eine orientierende Hypothesengenerierung.

4.2 TRAIL-Rezeptoren

Der tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ist ein potenter Apoptoseinduktor, der spezifisch auf Tumorzellen wirkt. Jedoch stellt die Apoptoseresistenz vieler Tumorzellen gegenüber TRAIL eine Hürde im klinischen Nutzen dar (Buneker et al. 2012). Über den TRAIL-Rezeptor können zudem auch nicht-apoptotische Signalwege über das Zielprotein NF κ B vermittelt werden, das eine Vielzahl von Apoptose-modulierenden Proteinen beeinflusst und somit einen Untergang der Zelle verhindert (Wajant et al. 2003). Um TRAIL klinisch nutzen zu können, sollten, nach Klärung der zugrundeliegenden intrazellulären Mechanismen, idealerweise die anti-apoptotischen Signalwege inhibiert und die pro-apoptotischen Faktoren verstärkt werden.

In dieser Arbeit wurden die TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und 4, sowie der TRAIL-Ligand untersucht. Bei der Auswertung wurden getrennt Scores für das Auftreten in Zytoplasma und Zellkern erhoben. Der Nachweis dieser Rezeptoren in malignen Pankreaszellen oder in chronischer Pankreatitis ist in früheren Studien bereits beschrieben worden. In gesundem Pankreasgewebe sind die Expressionslevel der TRAIL-Rezeptoren hingegen eher niedrig (Hasel et al. 2003; Ozawa et al. 2001; Stadel et al. 2010). TRAIL hat jedoch nicht nur antitumoröse Eigenschaften: Es konnte nachgewiesen werden, dass nach Stimulation der TRAIL-Rezeptoren mit einem rekombinanten Liganden die Invasivität Apoptose-resistenter Pankreaskarzinomzellen gesteigert wird. Dies führte im Mausmodell zu einer signifikant

gesteigerten hepatischen Metastasierungsrate (Trauzold et al. 2006). Darüberhinaus wurde nach dem Knockdown von TRAIL-Rezeptor 2 in PDAC-Zellen eine Verlangsamung des malignen Zellwachstums im Tierversuch beobachtet (Haselmann et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde der TRAIL-Rezeptor 1 in 84,7% der Fälle im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen und in 74,4% im Zellkern. Die statistische Kaplan-Meier-Analyse ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Stärke und zellulärer Lokalisation der Expression und dem medianen Gesamtüberleben der Patienten. Ähnliches gilt für den TRAIL-Rezeptor 2, auch in dieser Gruppe gab es keine signifikante Korrelation zwischen Rezeptorexpression und Überlebensdauer. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer TRAIL-Rezeptor-Studie zum Pankreaskarzinom (Gallmeier et al. 2013) und weiteren Tumorentitäten, dem Endometriumkarzinom und dem kolorektalen Karzinom (Gottwald et al. 2013; Kriegl et al. 2012). In der Arbeit von Kriegl et al. wird postuliert, dass sich die Intensität der TRAIL-Rezeptor-Expression in der Zellmembran im Verlauf der Tumorerkrankung regelhaft ändert und demzufolge dahingehend kein Zusammenhang zu der Prognose der Patienten abgeleitet werden kann.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um PD Dr A. Trauzold, Institut für Experimentelle Tumorforschung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, legen nahe, dass der TRAIL-induzierte Zelltod in PDAC-Zellen hauptsächlich über den TRAIL-Rezeptor 1 mediiert wird und weniger über den TRAIL-Rezeptor 2, der ebenfalls eine Todesdomäne an seiner intrazellulären Seite trägt (Lemke et al. 2010). In dieser Arbeit gelang der TRAIL-Rezeptor 2-Nachweis, bis auf eine Ausnahme, im Zytoplasma aller untersuchten Karzinomfälle. Eine nukleäre Expression fand sich in 82,1% der Fälle. Auch in HeLa- und hepatischen Karzinomzellen wurde der Rezeptor in diesen Lokalisationen bereits beschrieben (Kojima et al. 2011) und ebenfalls in einer Arbeit zu dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom. Dort befand sich der Rezeptor in 27% der Tumorfälle im Kern der Zellen und nahezu in allen malignen Zellen im Zytoplasma (Leithner et al. 2009).

Der Decoy-Rezeptor TRAIL 4 ist aufgrund seiner unvollständigen Todesdomäne nicht in der Lage Apoptose auszulösen. Durch Expression des Rezeptors sind die Zellen in der Lage, sich dem programmierten Zelltod zu entziehen. Er konnte in dieser Arbeit in 67,7% der Fälle im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen werden, davon fiel etwa die Hälfte der Positivitäten schwach aus. Ein nukleärer Nachweis von TRAIL-R4 gelang in schwacher Form in 2 Fällen (5,4%). Ein ähnliches Resultat ergab eine frühere TRAIL-Rezeptor-Studie zum Pankreaskarzinom, TRAIL-R4 wurde in 69% der Fälle nachgewiesen, dabei in 16% mit einer hohen Intensität. Der Rezeptornachweis beschränkte sich dabei ausschließlich auf das

Zytoplasma und besaß keine prognostische Relevanz hinsichtlich der Überlebensdauer der untersuchten Patienten (Gallmeier et al. 2013). Eine signifikante Korrelation zwischen Rezeptorexpression und Patientenüberleben konnte auch in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Bei der mikroskopischen Auswertung der mit dem TRAIL-R4 gefärbten PDAC-Kohorte fiel nicht nur eine Reaktivität in den Tumorzellen, sondern auch eine teilweise starke Expression in einigen pankreatischen Inselzellverbänden auf, die, soweit mikroskopisch beurteilbar, morphologisch unauffällig waren. Diese Beobachtung wurde auch in einer weiteren Arbeit zum Pankreaskarzinom gemacht. Hier waren neben TRAIL-R4-positiven Tumorzellen auch positive Inselzellen bei der Färbung mit TRAIL-R4 und dem TRAIL-Liganden beobachtet worden. Dies betraf sowohl gesundes, als auch in stärkerer Ausprägung, maligne verändertes Pankreasgewebe (Sanlioglu et al. 2009).

4.2.1 Subzelluläre Verteilung der TRAIL-Rezeptoren

Zusätzlich zu der Membranexpression werden TRAIL-Rezeptoren auch im Zytosol der untersuchten Zellen gefunden. Dabei war bislang unklar, ob die zytoplasmatischen Rezeptoren in gelöster Form vorliegen, oder ob sie in den Membranen der Zellorganellen lokalisiert sind, welche an Endozytose und Sekretion innerhalb der Zelle beteiligt sind. Zytoplasmatisch gelöstes TRAIL-R1 und TRAIL-R2 konnte bereits in Tumorzellen nachgewiesen werden, die genaue Funktion dieser Rezeptoren ist jedoch noch nicht geklärt (Haselmann et al. 2014). Andere Arbeitsgruppen konnten die TRAIL-Rezeptoren im Golgi-Apparat von Kolonkarzinomzellen (Oikonomou et al. 2009) und in den Autophagosomen von Brustkrebszellen detektieren. Eine Behandlung mit Autophagie-Inhibitoren führte zu einem Wiederauftreten der TRAIL-Rezeptoren an der Zelloberfläche und zu einem verstärkten Ansprechen auf TRAIL-vermittelte Apoptose (Di et al. 2013). Ein Austausch von TRAIL-Rezeptoren innerhalb der unterschiedlichen Zellkompartimente beeinflusst demnach die Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose und sollte in weiteren Studien näher untersucht werden.

4.3 Ligand TRAIL

Fast alle in dieser Arbeit untersuchten Fälle (91,9%) exprimierten den TRAIL-Liganden im Zytoplasma, besonders perinukleär. Ein nukleärer Nachweis gelang in 27%. Neben den Tumorzellen waren auch einige Inselzellen positiv in der Färbung. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Arbeit zur TRAIL-Ligand/-Rezeptor-Distribution im fetalen Pankreas, wo eine starke Anfärbung der Inselzellen besonders an der Zellmembran und im Zytoplasma

beobachtet wurde (Chen, L. H. et al. 2003). Auch eine Studie zum Pankreaskarzinom wies den TRAIL-Liganden in dukталen Zellen und in den Langerhanszellen nach. Dabei korrelierte eine starke Ligand-Expression mit einer erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen (Sanlioglu et al. 2008). Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der medianen Überlebenszeit der Patienten und dem Vorkommen des Liganden im Zytoplasma oder im Kern der Tumorzellen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Neben der Expression des Liganden in pankreatischen Zellen fielen auch starke Positivitäten in den Endothelzellen der mitangeschnittenen Gefäße auf. In einer Arbeit über Endothelzellen der Nabelschnurvene ist die gleiche Beobachtung gemacht und postuliert worden, dass der TRAIL-Ligand nicht nur eine Rolle in der Regulation der Apoptose, sondern auch im Stickstoffoxid-Haushalt von Gefäßzellen spielt (Di Pietro et al. 2006). Bei der mikroskopischen Auswertung der Schnitte fiel auch eine starke Anfärbung von Zellen des peripheren Nervensystems auf. Der TRAIL-Ligand ist als Apoptoseauslöser nach ischämischen Ereignissen im zentralen Nervensystem beschrieben (Kichev et al. 2014) und auch in einer Arbeit zur Lokalisation des TRAIL-Liganden in den verschiedenen menschlichen Geweben wurde das Antigen in nervalen Zellen gefunden (Spierings et al. 2004).

4.4 HMGA2

Das HMGA2-Protein wird normalerweise in fetalen, nicht jedoch in gut differenzierten adulten Geweben exprimiert. Mit Verlust der Zelldifferenzierung ist HMGA2 in diversen Tumorentitäten nachweisbar (Kong et al. 2014; Kumar et al. 2014; Li, A. Y. et al. 2011). In der Tumorzelle ist das Protein hauptsächlich nukleär lokalisiert, z.B. laut einer Arbeit zum Pankreaskarzinom in 44% der untersuchten Tumorzellkerne (Hristov, Alexandra C. et al. 2008). Ein verstärkter intrazellulärer Nachweis von HMGA2 ist häufig mit einer geringeren Zelldifferenzierung, erhöhten Metastasierungsraten und einer schlechteren Prognose für den Patienten vergesellschaftet. Seltener ist es zytoplasmatisch nachweisbar (Abe et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde HMGA2 in 65,8% der Fälle im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen und nukleäre Positivitäten fanden sich in 18,4%. Ursächlich für diese unerwartete Verteilung kann, neben einer tatsächlich schwächer nukleären als zytoplasmatischen Expression von HMGA2 in der untersuchten Kohorte, die Qualität des verwendeten Antikörpers sein. In anderen Arbeiten, in denen immunhistochemische Färbungen mit dem hier verwendeten Antikörper von Santa Cruz durchgeführt worden sind, wurde das Antigen vornehmlich nukleär detektiert (Prasad, N. B. et al. 2008; Qian et al. 2009). Eine weitere mögliche Ursache kann die Schnittqualität sein. Nachdem die Färbung von

HMGA2 an Schnitten, die etwa ein Jahr lang geschnitten bei 4° Celsius gelagert worden waren ubiquitär sehr schwach ausfiel, wurde die Färbung an einer Reihe frisch geschnittener Präparate wiederholt, bei denen jedoch die gleiche subzelluläre Verteilung beobachtet wurde. Neben den Tumorzellen waren auch basale Stammzellen in den intestinalen Krypten positiv für die Färbung mit HMGA2. Diese Beobachtung wurde auch in einer weiteren Arbeit gemacht und postuliert, dass das Protein dort eine Rolle in der Epithelproliferation und Zelldifferenzierung spielen könnte (Madison et al. 2013).

In dieser Arbeit konnte keine signifikante Korrelation zwischen einer zytoplasmatischen oder nukleären Expression von HMGA2 und dem medianen Patientenüberleben gefunden werden. In diversen Studien ist ein signifikanter Zusammenhang zwischen starker HMGA2-Expression und herabgesetzten Überlebenszeiten sowie einer höheren lymphatischen Metastasierungsrate beschrieben worden (Hristov, A. C. et al. 2009; Miyazawa et al. 2004; Young et al. 2007).

4.5 CD95

Der Todesrezeptor CD95 ist kaum in gesundem humanem Pankreasgewebe exprimiert. Eine Hochregulation der Rezeptordichte ist jedoch bei Entzündungsprozessen oder maligner Transformation der Zellen zu beobachten (Hasel et al. 2001). Obwohl in vielen PDAC-Zelllinien eine starke Expression des Todesrezeptors nachgewiesen werden konnte, waren die Zellen trotzdem weitgehend resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Dieser Umstand ist jedoch nicht einer Herabregulation der Todesrezeptormenge geschuldet, sondern wird vermutlich vielmehr auf intrazellulärer Ebene reguliert (Hinz et al. 2000; Kornmann et al. 2000; Ungefroren et al. 1998). In einer Arbeit von Winterhoff et al. zum duktalem Adenokarzinom des Pankreas wurde unter in vitro Bedingungen CD95 hauptsächlich in der Plasmamembran der Tumorzellen nachgewiesen, während andere Zellen keine Immunreaktivität aufwiesen oder selten eine intrazelluläre Färbung beobachten ließen. Eine anschließende Stimulation mit einem agonistischen CD95-Liganden verstärkte die intrazellulär nachweisbare Menge des Rezeptors (Ungefroren et al. 2001; Winterhoff et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde der Rezeptor in allen untersuchten Fällen im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen, dabei war seine Expression in 63,2% als stark zu bewerten. Das Farbsignal erschien membranös betont und granuliert im Zytoplasma, vereinbar mit einer endosomalen Lokalisation nach Internalisierung des Rezeptors (Foger et al. 2009). Ein nukleärer Nachweis gelang in 57,9%, dieser fiel in 39,5% mäßig stark aus.

Weiterhin wurde untersucht, ob es einen signifikanten Zusammenhang zwischen Intensität und Anzahl positiver Tumorzellen in der immunhistochemischen Färbung mit dem CD95-Antikörper und den Überlebensdaten der Patienten gibt. Entsprechend der subzellulären Lokalisation des Rezeptors wurden Kaplan-Meier-Analysen durchgeführt und verschiedene signifikante Ergebnisse beobachtet. Betrachtet man die CD95-Expression im Zytoplasma der Tumorzellen, finden sich signifikant längere Überlebensraten bei hohem CD95-Vorkommen. Ähnliches gilt für die Anzahl der Tumorzellen mit positivem Zytoplasma. In Fällen mit hoher zytoplasmatischer Expression zeigt sich ein signifikant längeres Überleben.

Die Aussagen bezüglich eines Zusammenhanges zwischen CD95-Expression in den malignen Geweben und Überlebensraten der untersuchten Patienten werden in der Literatur kontrovers diskutiert.

So wurde die Beobachtung, dass eine hohe CD95-Expression im Zytoplasma der Karzinomzellen mit signifikant längerem Patientenüberleben einhergeht auch in anderen Arbeiten zum Pankreaskarzinom beschrieben (Bernstorff et al. 2002; He et al. 2014).

Weiterhin wird angeführt, dass eine niedrige zytoplasmatische CD95-Expression in pankreatischen Adenokarzinomzellen mit signifikant erhöhten Raten für die perineurale Invasion der Tumorzellen und somit mit einer verstärkten biologischen Aggressivität vergesellschaftet ist (He et al. 2012).

Dem entgegen stehen die Ergebnisse von Arbeiten über andere Tumorentitäten. So zum Beispiel in einer Veröffentlichung über das Nierenzellkarzinom, in der die Autoren beschreiben, dass eine hohe zytoplasmatische CD95-Expression einen negativen unabhängigen prognostischen Faktor für die Prognose der betroffenen Patienten darstellt. Eine starke Expression geht demnach mit verstärkten Raten für die Lymphknotenmetastasierung und kürzeren Überlebensraten einher (Macher-Goeppinger et al. 2011; Sejima et al. 2012).

Arbeiten über das Ösophaguskarzinom und das Magenkarzinom wiesen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der CD95-Expression in Tumorzellen und einer prognostischen Relevanz für das Patientenüberleben nach. Jedoch waren die CD95-Level der Tumorzellen für das Ösophaguskarzinom mit 15% Positivität generell gering (Takikita et al. 2009) und in den Magenkarzinomzellen mit 28% niedriger als im gesunden Kontrollgewebe (mit 48% Positivität) (Gryko et al. 2011).

4.6 TNF-Rezeptor 1

Der TNF-Rezeptor 1 ist in zahlreichen Geweben konstitutiv exprimiert und trägt eine Todesdomäne, der TNF-Rezeptor 2 findet sich hingegen hauptsächlich auf Immun- und

Endothelzellen und ist aufgrund seiner fehlenden DD nicht in der Lage, eine Apoptose der Zelle auszulösen (Bremer 2013). Ursprünglich wurde TNF beschrieben als ein Mediator, der eine hämorrhagische Nekrose in Tumorzellen auslöst. In präklinischen Studien wurde eine antitumoröse Wirkung festgestellt, die über eine TNFR1-Aktivierung durch lösliches TNF vermittelt wurde (Old 1988). Ein systemischer Einsatz von TNF war jedoch von einer erheblichen Toxizität auf den Organismus begleitet und daher ist diese Therapieform ungeeignet (Creagan et al. 1988).

Nach neueren Erkenntnissen vermittelt TNF jedoch nicht nur den Untergang maligner Zellen, sondern kann auch das Überleben und die Proliferation des Zellverbandes verursachen. Über verschiedene intrazelluläre Signalwege kann außerdem die Migration und Invasion von Tumorzellen und die Neoangiogenese in dem malignen Gewebe mediert werden (Kitakata et al. 2002; Waters et al. 2013). So folgt auf die Stimulierung des TNF-Rezeptors 1, reguliert durch intrazelluläre Proteine, entweder die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B mit konsekutiver Erhaltung der Zelle oder die Apoptose via JNK oder Caspase-Aktivierung (Barnhart et al. 2003; Micheau et al. 2003).

In dieser Arbeit wurde zunächst die subzelluläre Verteilung des TNF-Rezeptors untersucht. In 79,9% der Fälle wurde er im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen und nukleäre Positivreaktionen fanden sich in 13,2% der Fälle. Ferner wurde der Zusammenhang zwischen TNFR1-Expression und der Überlebenszeit der Pankreaskarzinompatienten untersucht, zu dem man in der Literatur unterschiedliche Angaben findet. In der vorliegenden Arbeit korrelierte eine starke Expression von TNFR1 im Zytoplasma der Tumorzellen signifikant ($p=0,031$) mit verlängerten Lebensraten der betroffenen Patienten (negativ bis schwache Expression: Median: 5 Monate $\pm 2,898$; KI: 0,000-10,681 vs. mäßige bis starke Expression: Median: 21 Monate $\pm 8,784$; KI: 3,783-38,217). Die Kaplan-Meyer-Analyse für die Anzahl der Tumorzellen mit positivem Zytoplasma weist die gleiche Tendenz auf, liegt mit $p=0,094$ jedoch außerhalb des Signifikanzbereiches.

Chopra et al. beschreiben, dass dem TNFR1 im Pankreaskarzinom sowohl eine pro-, als auch antitumoröse Rolle zukommt. TNFR1-defiziente Mäuse waren nicht in der Lage implantierte PDAC-Zellen spontan abzustößen und wiesen darüber hinaus eine rasche Tumorprogression und eine verstärkte Vaskularisierung in den Tumorgeweben gegenüber Wildtyp-, TNF-defizienten- und TNFR2-defizienten Mäusen auf. Erklärt wird diese Beobachtung durch den niedrigen CD8-Spiegel in den TNFR1-defizienten Mäusen, der eine T-Zell-regulierte Immunüberwachung und Tumorzellabstoßung nicht möglich macht. Auf der anderen Seite verursachte eine exogene Stimulation des TNFR1 mit rekombinantem TNF in Tumor-

tragenden Individuen eine beschleunigte Tumorprogression (Chopra et al. 2013; Egberts et al. 2008).

In einer Arbeit zu der TNFR-1-Expression in kolorektalen Adenokarzinomzellen wird TNFR-1 als positiver unabhängiger prognostischer Faktor eingestuft. Es gab eine signifikante Korrelation mit dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen und den Überlebensraten der Patienten, so ging eine starke TNFR-1-Expression in den Tumorzellen mit einer besseren Prognose einher als schwache Expressionslevel (77,8% vs. 60,3%) (Yoshimura et al. 2003).

In anderen Veröffentlichungen wiederum sind hohe Expressionslevel des TNFR1 mit einer schlechteren Prognose für den Patienten vergesellschaftet. Zu diesem Ergebnis kam eine Arbeitsgruppe, die Knochenmetastasen von Tumoren mesenchymalen und epithelialen Ursprungs hinsichtlich der Prognosefähigkeit der TNFR-1-Expressionslevel untersucht hat. Der Nachweis des Rezeptors in Tumorzellen korreliert signifikant mit einer schlechteren Prognose im Vergleich zu TNFR-1-negativen Fällen (Chiechi et al. 2013). Ähnliches wurde in einer Studie zu Melanomzellen festgestellt: TNFR-1 und TNFR-2 haben besonders bei gemeinsamer Expression eine Tumor-fördernde Wirkung (Arnott et al. 2004). In einer Veröffentlichung über B-Zell-Lymphome ließ sich der Rezeptor in 52% der untersuchten Tumorzellen nachweisen und korrelierte signifikant mit herabgesetzten Überlebensraten (Nakayama et al. 2014).

Eine genauere Analyse der intrazellulären Vorgänge nach TNFR1-Stimulation und der Regulationsmechanismen der Signalwege ist nötig um genauere Aussagen über den Stellenwert des TNFR1 in Tumorzellen machen zu können und diese Kenntnisse möglicherweise in der Krebstherapie nutzen zu können.

4.7 TNF-Ligand

Das multifunktionelle Zytokin Tumornekrosefaktor α ist ein wichtiger Botenstoff des Immunsystems und vermittelt Apoptose, Zellproliferation, inflammatorische Prozesse und die Immunantwort über seine beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2. Ausgeschüttet wird es hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen, insbesondere als Reaktion auf entzündliche Prozesse (Tartaglia et al. 1992). In geringerem Maße wird es auch von Tumorzellen exprimiert. Obwohl die Moleküle der intrazellulären Signalkaskade nach Stimulation des TNFR1, welcher für die Hauptwirkung von TNF α verantwortlich ist, weitgehend identifiziert wurden, ist die Regulation dieser verschiedenen Mechanismen nicht gänzlich geklärt (van Horssen et al. 2006). Nach der Entdeckung, dass TNF α eine hämorrhagische Nekrose in Tumorzellen der Maus hervorruft (Carswell et al.

1975), wurden weitere Untersuchungen zu den Möglichkeiten der antitumorösen Therapie von TNF α durchgeführt. Es ist ein synergistischer Effekt bei der Kombinationstherapie von TNF α und der Chemotherapie von Melanomen und Weichteilsarkomen in vivo beschrieben (Manusama et al. 1996). Auf der andere Seite ist in einer Arbeit von Schmiegel et al. beschrieben, dass TNF α die Expression von EGFR (epidermal growth factor receptor) und dessen Liganden TGF α in Pankreaskarzinomzellen stimuliert und damit zum Wachstum des Zellverbandes beiträgt (Schmiegel et al. 1993). Die Wirkung von Immunzellen auf maligne Zellen hat demnach unterschiedliche Effekte zur Folge. Sie können Tumorzellen identifizieren und zerstören und wirken so der Entstehung einer Krebserkrankung entgegen (Swann et al. 2007). Auf der anderen Seite schaffen sie eine optimale Umgebung für die Tumorzellen, indem sie die Produktion inflammatorischer Zytokine stimulieren, welche Vorgänge wie Angiogenese, Tumorzellinvasion und Metastasierung begünstigen und somit zum Progress der Tumorerkrankung beitragen (Balkwill 2004; Charles et al. 2009). In früheren Studien ist beschrieben, dass kontinuierlich niedrige TNF α -Spiegel die frühen Stufen in der Tumorentwicklung unterstützen (Arnott et al. 2004; Suganuma et al. 1999). Hohe Dosen, die nur über einen kurzen Zeitraum wirken, induzieren hingegen die Apoptose in den Tumorzellen und ihren versorgenden Gefäßen (Carswell et al. 1975; Stoelcker et al. 2000). Zudem kommt TNF α eine Rolle in der Tumorgenese zu: Es gibt erwiesenermaßen einen Zusammenhang zwischen chronischer Entzündung, begleitet durch die Invasion von Immunzellen und proinflammatorischer Zytokine, und der Entstehung neoplastischer Läsionen in vielen verschiedenen Geweben (Jura et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde TNF α in 45,4% der Fälle im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen. In den Zellkernen der untersuchten PDAC-Fälle wurde kein Tumornekrosefaktor α detektiert. Das Vorkommen von TNF α in Tumorzellen wurde bereits beschrieben und beobachtet, dass die neoplastischen Zellen den Tumornekrosefaktor selbst produzieren können (Kitakata et al. 2002; Sethi et al. 2008). Es konnte nachgewiesen werden, dass diese autokrine Stimulation PDAC-Zellen vor der Apoptose durch exogen zugeführtes TNF α und Adriamycin schützt (Watanabe et al. 1996). In vivo produzieren auch Tumordinfiltrierende Immunzellen wie Monozyten, Lymphozyten und andere Stromazellen den Tumornekrosefaktor α , der den Verlauf der Tumorerkrankung beeinflussen kann. Egberts et al. machten in ihrer Studie zum Adenokarzinom des Pankreas die Entdeckung, dass TNF α in den Stromazellen von Tumorzidiven stärker exprimiert war als in den untersuchten Primärtumoren. Aus dieser Beobachtung leitete die Arbeitsgruppe ab, dass der von den PDAC-Zellen sezernierte Tumornekrosefaktor α sekundär die TNF α -Produktion in dem

umliegenden Gewebe stimuliert und diese Verstärkerschleife einen Erklärungsansatz für die starke Malignität des Tumorrezidivs darstellt (Egberts et al. 2008).

Hinsichtlich des Zusammenhangs zwischen TNF α -Nachweis in den Tumorzellen und einer Überlebensprognose betroffener Patienten konnte in dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden, die erhobenen Werte aus der Kaplan-Meyer-Analyse waren nicht signifikant.

In dem Zusammenhang zwischen Inflammation und Tumorgenese kommt TNF α möglicherweise eine Schlüsselrolle zu. Daher ist das Zytokin ein interessanter Angriffspunkt für zukünftige Therapien, doch der klinische Nutzen von TNF α in der antitumorösen Therapie ist umstritten. Obgleich durch den Einsatz von Biologicals mit Anti-TNF α -Aktivität Entzündungsprozesse eingedämmt werden können, ist es auch möglich, dass diese Medikamente eine Tumorentstehung fördern könnten, da eine TNF α -Blockade die natürliche anti-tumoröse Überwachung durch die körpereigenen Immunzellen unterbindet (Grimm et al. 2011). Diese Beobachtungen einer erhöhten Lymphominzidenz bei Patienten, die aufgrund ihrer Rheumatoiden Arthritis mit TNF α -Antagonisten behandelt werden basieren jedoch auf wenigen Fällen und bedürfen weiterer Untersuchung (Geborek et al. 2005).

4.8 Koexpression der untersuchten Rezeptoren und Liganden:

In dieser Arbeit wurde erstmalig untersucht, ob es einen statistisch signifikanten Zusammenhang bezüglich des Auftretens der untersuchten Todesrezeptorsysteme untereinander entsprechend ihrer subzellulären Verteilung gibt. In früheren Studien sind einzelne Todesrezeptoren und –liganden dahingehend untersucht worden, über eine vergleichende Analyse der Expressionsmuster unterschiedlicher Mitglieder der TNF-Superfamilie liegen bislang jedoch keine Daten vor. Die durchgeführte Koexpressionsanalyse in dieser Arbeit bietet daher einen vielversprechenden Ansatz, um zum besseren Verständnis der Rolle der verschiedenen Todesrezeptoren in Karzinomzellen beizutragen.

Entsprechend des im Institut für Pathologie des UKSH Campus Kiel gängigen Scoring Systems für immunhistochemische Färbungen wird bei der Auswertung der Fälle sowohl die Farbintensität als auch die prozentuale Anzahl positiv gefärbter Pankreaskarzinomzellen berücksichtigt. Die Werte werden für das Zytoplasma und den Kern der Zellen getrennt erhoben.

Es fanden sich mehrere hochsignifikante und signifikante Ergebnisse bei der Auswertung der Fälle. Bezüglich aller Werte für das Zytoplasma gibt es einen hochsignifikant positiven Zusammenhang zwischen dem Nachweis von TNF-Rezeptor 1 und seinem Liganden TNF α . Eine Koexpression der TRAIL-Rezeptoren 1 und 2 wurden in dieser Arbeit im Kern der

Tumorzellen beobachtet. Auch in einer früheren Arbeit zur Expression von TRAIL-R1 und 2 in verschiedenen Tumorentitäten wurde das gleichzeitige Vorkommen beider Rezeptoren in mehreren Zelllinien beschrieben (Kischkel et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit kritisch betrachtet werden sollte die Beobachtung, dass TRAIL-R2 und HMGA2 hinsichtlich ihrer nukleären Expression eine negative Korrelation aufweisen. In der Literatur wird ein positiver Zusammenhang der beiden Antigene in Tumorzellen beschrieben. Bei starker gemeinsamer nukleärer Expression von TR2 und HMGA2 belegen Studien die Assoziation mit signifikant verkürzten Überlebensraten (Bertsch et al. 2014). Auffällig ist die signifikante Koexpression von TNF-Rezeptor 1 und TRAIL-Ligand. Diese Beobachtung gilt für prozentuale Anzahl der zytoplasmatisch positiven Zellen, den Zytoplasma-score und die erhobenen nukleären Werte, wobei zu berücksichtigen ist, dass die beiden Antigene im Zellkern nur selten zu finden sind. Für die zytoplasmatischen Werte wurde beobachtet, dass der TRAIL-Rezeptor 4 signifikant mit der Expression von HMGA2 einhergeht. In der Analyse aller betrachteten Kernparameter fallen signifikante Zusammenhänge zwischen der Expression von HMGA2 und CD95 auf. Der Gesamtscore wird durch eine Addition der Summenscores für das Zytoplasma und den Kern der Adenokarzinomzellen gebildet. Hochsignifikante Ergebnisse zeigten sich dort für die Koexpression von dem TNF-Rezeptor 1 und sowohl dem Ligand TRAIL, als auch CD95. Korrelationen im Signifikanzbereich wiesen TNF-Rezeptor 1 und HMGA2, CD95 und HMGA2, sowie TRAIL-Rezeptor 4 und der Ligand TRAIL auf. Die „nur“ signifikante Koexpression von TNFR1 und dem TNF-Liganden hinsichtlich des Gesamtscores lässt sich dadurch erklären, dass der TNF-Rezeptor 1 in einigen Fällen im Zellkern detektiert wurde, TNF α hingegen nicht, der Gesamtscore jedoch zur Hälfte aus den nukleären Werten gebildet wird.

Ein vielversprechender Ansatz in zukünftigen Studien wäre die Durchführung von Mehrfachfärbungen auf einem Schnitt. Damit gelänge eine bessere Vergleichbarkeit der untersuchten Zellen und somit eine noch genauere Analyse der Koexpression.

4.8.1 Korrelation mit den Daten tumorbefallener Lymphknoten:

Mit der Korrelationsanalyse Kendall-Tau wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression der verschiedenen Antigene und einem nodalen Tumornachweis gibt. Für diese Analyse wurden die Werte dichotomisiert. Signifikante Werte ließen sich aus der Untersuchung nicht erheben, die Ergebnisse sind im Anhang in Tabelle 30 aufgeführt.

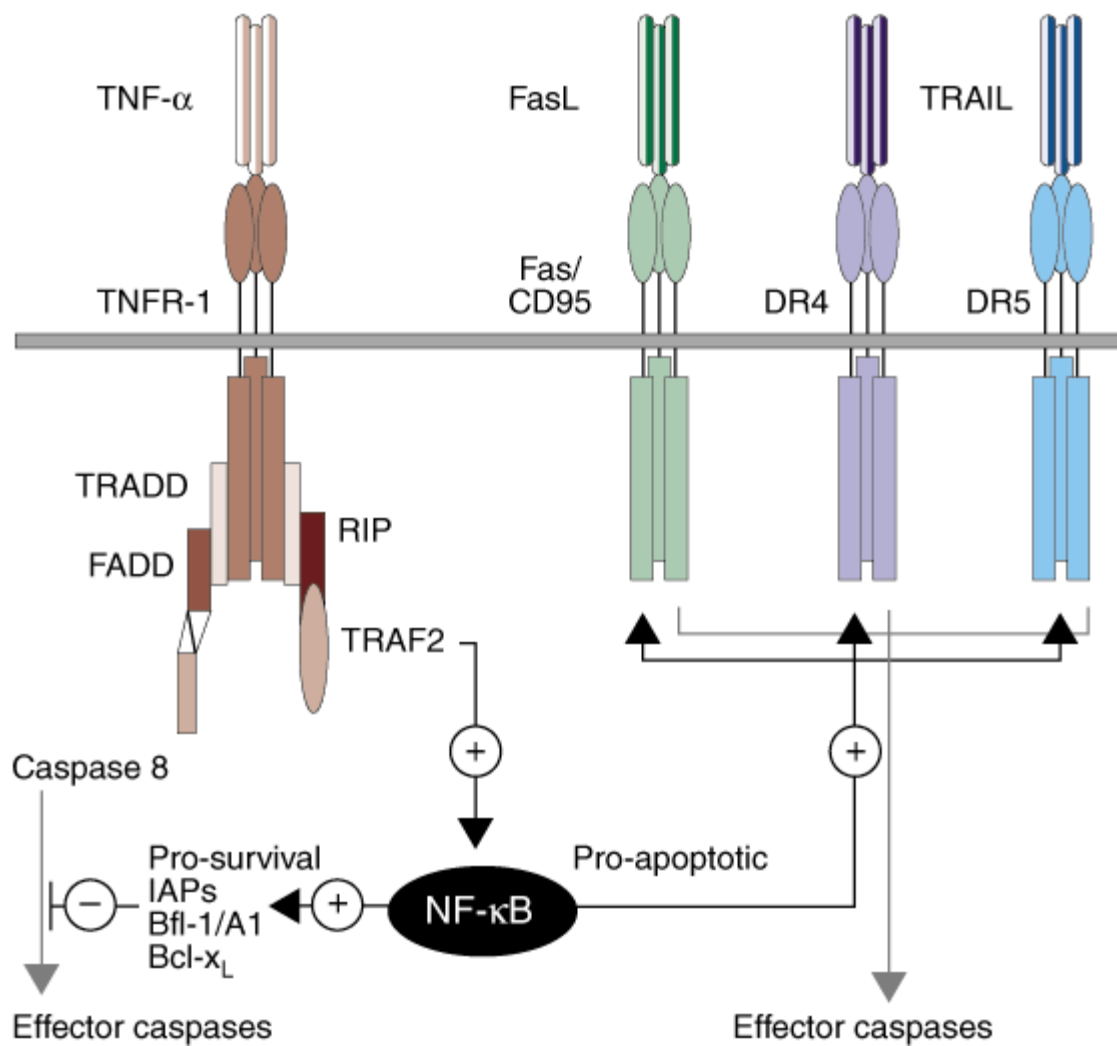


Abb.4: Schema zur Interdependenz der Rezeptoren und Liganden aus “Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-κB” (Ravi et al. 2001)

5 Zusammenfassung

Das pankreatische Adenokarzinom besitzt eine ausgesprochen schlechte Prognose und ist durch eine frühzeitige Metastasierung und eine hohe Apoptoseresistenz gekennzeichnet. Die PDAC-Zellen sprechen nur schlecht auf die üblichen Therapieverfahren wie Chemotherapie und Bestrahlung an und neben der chirurgischen Therapie gibt es kaum alternative Möglichkeiten in der Behandlung dieser Tumorerkrankung (Roder et al. 2011). Obwohl viele pankreatische Krebszelllinien Todesrezeptoren exprimieren, sind sie weitestgehend resistent gegenüber dieser Rezeptor-vermittelten Apoptose (Bai et al. 2005).

In dieser Arbeit wurde die Expression der Todesrezeptorsysteme TRAIL-R1/-2/-4, TNF-R1, CD95 und ihrer Liganden im Kern, im Zytoplasma und in der Zytoplasmamembran von 41 PDAC-Fällen untersucht, die das TNM-Stadium T3N1 aufwiesen. Mögliche Zusammenhänge zwischen Antigennachweis und Überlebensraten, sowie die Koexpression der untersuchten Antigene untereinander wurden erforscht. Mittels Immunhistochemie wurden die TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und 4, der TRAIL-Ligand, das HMGA2-Protein, CD95 und der TNF-Rezeptor 1, sowie sein Ligand TNF α in diesen Gewebeproben detektiert. Am Mikroskop wurden die Gewebe semiquantitativ mithilfe eines etablierten Scoring-Systems ausgewertet und die Ergebnisse schließlich statistisch untersucht.

Die drei TRAIL-Rezeptoren und der TRAIL-Ligand konnten in einem Großteil der Tumorzellen sowohl im Zytoplasma, als auch im Zellkern nachgewiesen werden. Signifikante Korrelationen mit der Überlebenszeit der Patienten konnten in diesem Kollektiv jedoch nicht festgestellt werden. Gleiches gilt für das HMGA2-Protein. Vor dem Hintergrund seiner Lokalisationen in Zytoplasma und Nukleus konnte kein Rückschluss auf die Prognose der Erkrankten gezogen werden. Die Färbung des CD95-Rezeptors ergab Positivitäten im Zytoplasma aller untersuchten PDAC-Fälle und ein nukleärer Nachweis gelang in mehr als der Hälfte der Gewebe. Eine starke Expression korrelierte hinsichtlich des zytoplasmatischen und nukleären Nachweises signifikant mit einem verlängerten Gesamtüberleben. Aufgrund der inhomogenen Verteilung der dichotomisierten Elemente sind die zytoplasmatischen Ergebnisse (Intensität: 5 vs. 33 Fälle; Anzahl positiver Zellen: 2 vs. 36 Fälle und Gesamtscore: 6 vs. 32 Fälle) jedoch kritisch zu betrachten. Positivitäten für den TNF-Rezeptor 1 gab es im Großteil der Fälle im Zytoplasma und selten im Zellkern, wobei eine starke zytoplasmatische Expression, analog zum CD95-Rezeptor, mit längeren Überlebensraten der Patienten korrelierte. Sein Ligand TNF α fand sich nur im Zytoplasma

einiger Tumorzellen in einem Teil der Fälle. Ein signifikanter Zusammenhang zu der Überlebenszeit der Betroffenen konnte nicht gefunden werden.

Die Koexpressionsanalysen ergaben folgende hochsignifikante Ergebnisse:

- TNF-Rezeptor 1 und sein Ligand TNF α bezüglich zytoplasmatischer und nukleärer Scores
- TNF-Rezeptor 1 und Ligand TRAIL im Hinblick auf die Anzahl positiver Tumorzellkerne. Eine signifikante Korrelation fand sich bezüglich der Intensität der Antigenexpression. Hochsignifikante Korrelationen zeigten sich hinsichtlich des Gesamtscores, welcher das intrazelluläre Gesamtvorkommen der Antigene in Zytoplasma und Zellkern zusammenfasst.
- Hinsichtlich des Gesamtscores korreliert der TNF-Rezeptor 1 sowohl mit dem Ligand TRAIL, als auch mit CD95. Gleiches gilt für HMGA2 und den TRAIL-Rezeptor 4.

Es fanden sich ferner mehrere signifikante Ergebnisse:

- TRAIL-Rezeptor 4 und HMGA2 bezogen auf die Zytoplasmawerte.
- HMGA2 und CD95 im Hinblick auf die nukleären Scores, sowie ebenso TRAIL-Rezeptor 1 und TRAIL-Rezeptor 2.
- Betrachtet man den Gesamtscore finden sich jeweils Korrelationen zwischen TNF-Rezeptor 1 und HMGA2, zwischen CD95 und HMGA2, sowie zwischen TRAIL-Rezeptor 4 und Ligand TRAIL.

Im Zuge der immunhistochemischen Färbungen konnte außerdem gezeigt werden, dass das Alter der verwendeten Schnitte einen großen Einfluss auf die Intensität dieser Färbungen hat. Frisch geschnittene Gewebe weisen eine deutlich stärkere Immunreaktivität auf.

Literaturverzeichnis

- Abe, N., Watanabe, T., Suzuki, Y., Matsumoto, N., Masaki, T., Mori, T., Sugiyama, M., Chiappetta, G., Fusco, A., Atomi, Y. (2003): An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *British journal of cancer*, 89, 2104-2109
- Aggarwal, B. B. (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology*, 3, 745-756
- Aggarwal, B. B., Schwarz, L., Hogan, M. E., Rando, R. F. (1996): Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells. *Cancer research*, 56, 5156-5164
- Arnott, C. H., Scott, K. A., Moore, R. J., Robinson, S. C., Thompson, R. G., Balkwill, F. R. (2004): Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. *Oncogene*, 23, 1902-1910
- Ashkenazi, A., Dixit, V. M. (1998): Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)*, 281, 1305-1308
- Bai, J., Sui, J., Demirjian, A., Vollmer, C. M., Jr., Marasco, W., Callery, M. P. (2005): Predominant Bcl-XL knockdown disables antiapoptotic mechanisms: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-based triple chemotherapy overcomes chemoresistance in pancreatic cancer cells in vitro. *Cancer research*, 65, 2344-2352
- Balkwill, F. (2004): Cancer and the chemokine network. *Nature reviews. Cancer*, 4, 540-550
- Barnhart, B. C., Peter, M. E. (2003): The TNF receptor 1: a split personality complex. *Cell*, 114, 148-150
- Belka, C., Betsch, A., Marini, P., Jendrossek, V., Bamberg, M., Budach, W. (2003): [Death inducing ligands in combination with ionizing radiation: objective and current knowledge]. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft ... [et al]*, 179, 141-151
- Bernstorff, W. V., Glickman, J. N., Odze, R. D., Farraye, F. A., Joo, H. G., Goedegebuure, P. S., Eberlein, T. J. (2002): Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape. *Cancer*, 94, 2552-2560
- Bertsch, U., Roder, C., Kalthoff, H., Trauzold, A. (2014): Compartmentalization of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor functions: emerging role of nuclear TRAIL-R2. *Cell Death Dis*, 5, e1390
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., Mathison, J., Ulevitch, R., Cerami, A. (1985): Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature*, 316, 552-554

- Bode, A. M., Dong, Z. (2007): The functional contrariety of JNK. *Molecular Carcinogenesis*, 46, 591-598
- Bremer, E. (2013): Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. *ISRN oncology*, 2013, 371854
- Broaddus, V. C., Dansen, T. B., Abayasiriwardana, K. S., Wilson, S. M., Finch, A. J., Swigart, L. B., Hunt, A. E., Evan, G. I. (2005): Bid mediates apoptotic synergy between tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and DNA damage. *The Journal of biological chemistry*, 280, 12486-12493
- Buneker, C. K., Yu, R., Deedigan, L., Mohr, A., Zwacka, R. M. (2012): IFN-gamma combined with targeting of XIAP leads to increased apoptosis-sensitisation of TRAIL resistant pancreatic carcinoma cells. *Cancer Lett*, 316, 168-177
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 3666-3670
- Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., Yang, X. (2002): c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO journal*, 21, 3704-3714
- Charles, K. A., Kulbe, H., Soper, R., Escorcio-Correia, M., Lawrence, T., Schultheis, A., Chakravarty, P., Thompson, R. G., Kollias, G., Smyth, J. F., Balkwill, F. R., Hagemann, T. (2009): The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *The Journal of clinical investigation*, 119, 3011-3023
- Chen, L., Park, S.-M., Tumanov, A. V., Hau, A., Sawada, K., Feig, C., Turner, J. R., Fu, Y.-X., Romero, I. L., Lengyel, E., Peter, M. E. (2010): CD95 promotes tumour growth. *Nature*, 465, 492-496
- Chen, L. H., Liu, X. S., Wang, W. Y., Han, W. N., Pan, B. R., Jin, B. Q. (2003): Localization of TRAIL/TRAILR in fetal pancreas. *World journal of gastroenterology : WJG*, 9, 334-337
- Chiechi, A., Novello, C., Magagnoli, G., Petricoin, E. F., 3rd, Deng, J., Benassi, M. S., Picci, P., Vaisman, I., Espina, V., Liotta, L. A. (2013): Elevated TNFR1 and serotonin in bone metastasis are correlated with poor survival following bone metastasis diagnosis for both carcinoma and sarcoma primary tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19, 2473-2485
- Chopra, M., Lang, I., Salzmann, S., Pachel, C., Kraus, S., Bauerlein, C. A., Brede, C., Garrote, A. L., Mattenheimer, K., Ritz, M., Schwinn, S., Graf, C., Schafer, V., Frantz, S., Einsele, H., Wajant, H., Beilhack, A. (2013): Tumor necrosis factor induces tumor promoting and anti-tumoral effects on pancreatic cancer via TNFR1. *PloS one*, 8, e75737
- Creagan, E. T., Kovach, J. S., Moertel, C. G., Frytak, S., Kvolz, L. K. (1988): A phase I clinical trial of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer*, 62, 2467-2471
- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., Goodwin, R. G. (1997): The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*, 7, 813-820

- Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G., Smith, C. A. (1997): Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *The Journal of experimental medicine*, 186, 1165-1170
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y., Wu, X. (2003): A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell*, 115, 61-70
- Di Pietro, R., Mariggio, M. A., Guarnieri, S., Sancilio, S., Giardinelli, A., Di Silvestre, S., Consoli, A., Zauli, G., Pandolfi, A. (2006): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and its localization within the human vein endothelial cells (HUVEC) in culture. *Journal of cellular biochemistry*, 97, 782-794
- Di X, Zhang G, Zhang Y, Takeda K, Rosado LA, Zhang B. Accumulation of autophagosomes in breast cancer cells induces TRAIL resistance through downregulation of surface expression of death receptors 4 and 5. *Oncotarget* 2013; 4: 1349-1364.
- Du, X., Zhao, Y.-p., Zhang, T.-p., Zhou, L., Chen, G., Wang, T.-x., You, L., Shu, H. (2014): Alteration of the Intrinsic Apoptosis Pathway Is Involved in Notch-induced Chemoresistance to Gemcitabine in Pancreatic Cancer. *Archives of Medical Research*, 45, 15-20
- Eck, M. J., Sprang, S. R. (1989): The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *The Journal of biological chemistry*, 264, 17595-17605
- Egberts, J. H., Cloosters, V., Noack, A., Schniewind, B., Thon, L., Klose, S., Kettler, B., von Forstner, C., Kneitz, C., Tepel, J., Adam, D., Wajant, H., Kalthoff, H., Trauzold, A. (2008): Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits pancreatic tumor growth and metastasis. *Cancer research*, 68, 1443-1450
- Elmore, S. (2007): Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35, 495-516
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., Dul, E., Appelbaum, E. R., Eichman, C., DiPrinzio, R., Dodds, R. A., James, I. E., Rosenberg, M., Lee, J. C., Young, P. R. (1998): Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry*, 273, 14363-14367
- Foger, N., Bulfone-Paus, S., Chan, A. C., Lee, K. H. (2009): Subcellular compartmentalization of FADD as a new level of regulation in death receptor signaling. *The FEBS journal*, 276, 4256-4265
- French, L. E., Tschopp, J. (1999): The TRAIL to selective tumor death. *Nature medicine*, 5, 146-147
- Friess, H., Lu, Z., Andren-Sandberg, A., Berberat, P., Zimmermann, A., Adler, G., Schmid, R., Buchler, M. W. (1998): Moderate activation of the apoptosis inhibitor bcl-xL worsens the prognosis in pancreatic cancer. *Annals of surgery*, 228, 780-787
- Gallmeier, E., Bader, D. C., Kriegel, L., Berezowska, S., Seeliger, H., Goke, B., Kirchner, T., Bruns, C., De Toni, E. N. (2013): Loss of TRAIL-receptors is a recurrent feature in pancreatic

cancer and determines the prognosis of patients with no nodal metastasis after surgery. *PloS one*, 8, e56760

•Ganten, T. M., Sykora, J., Koschny, R., Batke, E., Aulmann, S., Mansmann, U., Stremmel, W., Sinn, H. P., Walczak, H. (2009): Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 87, 995-1007

•Garcea, G., Dennison, A. R., Pattenden, C. J., Neal, C. P., Sutton, C. D., Berry, D. P. (2008): Survival following curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. A systematic review of the literature. *JOP : Journal of the pancreas*, 9, 99-132

•Geborek, P., Bladstrom, A., Turesson, C., Gulfe, A., Petersson, I. F., Saxne, T., Olsson, H., Jacobsson, L. T. (2005): Tumour necrosis factor blockers do not increase overall tumour risk in patients with rheumatoid arthritis, but may be associated with an increased risk of lymphomas. *Annals of the rheumatic diseases*, 64, 699-703

•GEKID, R. a. (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Berlin: Robert Koch Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg); 2012.

•Gottwald, L., Szwalski, J., Piekarski, J., Pasz-Walczak, G., Kubiak, R., Szych, M., Suzin, J., Tylinski, W., Sek, P., Jeziorski, A. (2013): Membrane expression of the death ligand trail receptors DR4 and DR5 in the normal endometrium, endometrial atypical hyperplasia and endometrioid endometrial cancer. *Journal of obstetrics and gynaecology : the journal of the Institute of Obstetrics and Gynaecology*, 33, 512-518

•Granger, G. A., Shacks, S. J., Williams, T. W., Kolb, W. P. (1969): Lymphocyte in vitro cytotoxicity: specific release of lymphotoxin-like materials from tuberculin-sensitive lymphoid cells. *Nature*, 221, 1155-1157

•Gresham, G. K., Wells, G. A., Gill, S., Cameron, C., Jonker, D. J. (2014): Chemotherapy regimens for advanced pancreatic cancer: a systematic review and network meta-analysis. *BMC cancer*, 14, 471

•Griffith, T. S., Chin, W. A., Jackson, G. C., Lynch, D. H., Kubin, M. Z. (1998): Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161, 2833-2840

•Grimm, M., Lazariotou, M., Kircher, S., Hofelmayr, A., Germer, C. T., von Rahden, B. H., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M. (2011): Tumor necrosis factor-alpha is associated with positive lymph node status in patients with recurrence of colorectal cancer-indications for anti-TNF-alpha agents in cancer treatment. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 34, 315-326

•Gryko, M., Guzinska-Ustymowicz, K., Pryczynicz, A., Cepowicz, D., Kuklinski, A., Czyzewska, J., Kemona, A., Kedra, B. (2011): Correlation between Fas and FasL proteins expression in normal gastric mucosa and gastric cancer. *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 49, 142-147

•Han, H., Von Hoff, D. D. (2013): SnapShot: pancreatic cancer. *Cancer cell*, 23, 424-424 e421

- Hasel, C., Durr, S., Rau, B., Strater, J., Schmid, R. M., Walczak, H., Bachem, M. G., Moller, P. (2003): In chronic pancreatitis, widespread emergence of TRAIL receptors in epithelia coincides with neoexpression of TRAIL by pancreatic stellate cells of early fibrotic areas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 83, 825-836
- Hasel, C., Rau, B., Perner, S., Strater, J., Moller, P. (2001): Differential and mutually exclusive expression of CD95 and CD95 ligand in epithelia of normal pancreas and chronic pancreatitis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 81, 317-326
- Haselmann, V., Kurz, A., Bertsch, U., Hübner, S., Olempska-Müller, M., Fritsch, J., Häslér, R., Pickl, A., Fritsche, H., Annewanter, F., Engler, C., Fleig, B., Bernt, A., Röder, C., Schmidt, H., Gelhaus, C., Hauser, C., Egberts, J. H., Heneweer, C., Rohde, A. M., Böger, C., Knippschild, U., Röcken, C., Adam, D., Walczak, H., Schütze, S., Janssen, O., Wulczyn, F. G., Wajant, H., Kalthoff, H., Trauzold, A. (2014): Nuclear Death Receptor TRAIL-R2 Inhibits Maturation of Let-7 and Promotes Proliferation of Pancreatic and Other Tumor Cells. *Gastroenterology*, 146, 278-290
- He, C., Jiang, H., Geng, S., Sheng, H., Shen, X., Zhang, X., Zhu, S., Chen, X., Yang, C., Gao, H. (2012): Expression of c-Myc and Fas correlates with perineural invasion of pancreatic cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 5, 339-346
- He, C., Jiang, H., Geng, S., Sheng, H., Shen, X., Zhang, X., Zhu, S., Chen, X., Yang, C., Gao, H. (2014): Expression and prognostic value of c-Myc and Fas (CD95/APO1) in patients with pancreatic cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7, 742-750
- Helson, L., Green, S., Carswell, E., Old, L. J. (1975): Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature*, 258, 731-732
- Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., Ungefroren, H. (2000): Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene*, 19, 5477-5486
- Hristov, A. C., Cope, L., Reyes, M. D., Singh, M., Iacobuzio-Donahue, C., Maitra, A., Resar, L. M. (2009): HMGA2 protein expression correlates with lymph node metastasis and increased tumor grade in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 22, 43-49
- Hristov, A. C., Cope, L., Reyes, M. D., Singh, M., Iacobuzio-Donahue, C., Maitra, A., Resar, L. M. S. (2008): HMGA2 protein expression correlates with lymph node metastasis and increased tumor grade in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol*, 22, 43-49
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., Tschoopp, J. (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 190-195
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. (1991): The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 66, 233-243
- Jura, N., Archer, H., Bar-Sagi, D. (2005): Chronic pancreatitis, pancreatic adenocarcinoma and the black box in-between. *Cell Res*, 15, 72-77

- Kichev, A., Rousset, C. I., Baburamani, A. A., Levison, S. W., Wood, T. L., Gressens, P., Thornton, C., Hagberg, H. (2014): Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and cell death in the immature central nervous system after hypoxia-ischemia and inflammation. *The Journal of biological chemistry*, 289, 9430-9439
- Kimberley, F. C., Screaton, G. R. (2004): Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. *Cell Res*, 14, 359-372
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K. J., Ashkenazi, A. (2000): Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. *Immunity*, 12, 611-620
- Kitakata, H., Nemoto-Sasaki, Y., Takahashi, Y., Kondo, T., Mai, M., Mukaida, N. (2002): Essential roles of tumor necrosis factor receptor p55 in liver metastasis of intrasplenic administration of colon 26 cells. *Cancer research*, 62, 6682-6687
- Kojima, Y., Nakayama, M., Nishina, T., Nakano, H., Koyanagi, M., Takeda, K., Okumura, K., Yagita, H. (2011): Importin beta1 protein-mediated nuclear localization of death receptor 5 (DR5) limits DR5/tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced cell death of human tumor cells. *The Journal of biological chemistry*, 286, 43383-43393
- Kong, D., Su, G., Zha, L., Zhang, H., Xiang, J., Xu, W., Tang, Y., Wang, Z. (2014): Coexpression of HMGA2 and Oct4 predicts an unfavorable prognosis in human gastric cancer. *Med Oncol*, 31, 1-10
- Kornmann, M., Ishiwata, T., Kleeff, J., Beger, H. G., Korc, M. (2000): Fas and Fas-ligand expression in human pancreatic cancer. *Annals of surgery*, 231, 368-379
- Kriegel, L., Jung, A., Horst, D., Rizzani, A., Jackstadt, R., Hermeking, H., Gallmeier, E., Gerbes, A. L., Kirchner, T., Goke, B., De Toni, E. N. (2012): Microsatellite instability, KRAS mutations and cellular distribution of TRAIL-receptors in early stage colorectal cancer. *PloS one*, 7, e51654
- Krutz, F. A. E. (2008): TRAIL and cancer therapy. *Cancer Letters*, 263, 14-25
- Kumar, M. S., Armenteros-Monterroso, E., East, P., Chakravorty, P., Matthews, N., Winslow, M. M., Downward, J. (2014): HMGA2 functions as a competing endogenous RNA to promote lung cancer progression. *Nature*, 505, 212-217
- Leithauser, F., Dhein, J., Mechttersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K. M., Krammer, P. H., Moller, P. (1993): Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 69, 415-429
- Leithner, K., Stacher, E., Wurm, R., Ploner, F., Quehenberger, F., Wohlkoeig, C., Balint, Z., Polachova, J., Olschewski, A., Samonigg, H., Popper, H. H., Olschewski, H. (2009): Nuclear and cytoplasmic death receptor 5 as prognostic factors in patients with non-small cell lung cancer treated with chemotherapy. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 65, 98-104

- Lemke, J., Noack, A., Adam, D., Tchikov, V., Bertsch, U., Roder, C., Schutze, S., Wajant, H., Kalthoff, H., Trauzold, A. (2010): TRAIL signaling is mediated by DR4 in pancreatic tumor cells despite the expression of functional DR5. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 88, 729-740
- Li, A. Y., Lin, H. H., Kuo, C. Y., Shih, H. M., Wang, C. C., Yen, Y., Ann, D. K. (2011): High-mobility group A2 protein modulates hTERT transcription to promote tumorigenesis. *Molecular and cellular biology*, 31, 2605-2617
- Li, Y., Kong, D., Ahmad, A., Bao, B., Sarkar, F. H. (2013): Pancreatic cancer stem cells: Emerging target for designing novel therapy. *Cancer Letters*, 338, 94-100
- Lutz, M. P., Pourebrahim, S. (2008): [Pancreatic carcinoma]. *Der Internist*, 49, 1079-1086; quiz 1087
- Macher-Goeppinger, S., Bermejo, J. L., Wagener, N., Hohenfellner, M., Haferkamp, A., Schirmacher, P., Roth, W. (2011): Expression and prognostic relevance of the death receptor CD95 (Fas/APO1) in renal cell carcinomas. *Cancer Lett*, 301, 203-211
- Madison, B. B., Liu, Q., Zhong, X., Hahn, C. M., Lin, N., Emmett, M. J., Stanger, B. Z., Lee, J. S., Rustgi, A. K. (2013): LIN28B promotes growth and tumorigenesis of the intestinal epithelium via Let-7. *Genes & development*, 27, 2233-2245
- Manusama, E. R., Nooijen, P. T., Stavast, J., Durante, N. M., Marquet, R. L., Eggermont, A. M. (1996): Synergistic antitumour effect of recombinant human tumour necrosis factor alpha with melphalan in isolated limb perfusion in the rat. *The British journal of surgery*, 83, 551-555
- Matiba, B., Mariani, S. M., Krammer, P. H. (1997): The CD95 system and the death of a lymphocyte. *Seminars in immunology*, 9, 59-68
- Mc Guire, C., Beyaert, R., van Loo, G. (2011): Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends in Neurosciences*, 34, 619-628
- Micheau, O., Tschopp, J. (2003): Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114, 181-190
- Mirlacher, M., Kasper, M., Storz, M., Knecht, Y., Durmuller, U., Simon, R., Mihatsch, M. J., Sauter, G. (2004): Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol*, 17, 1414-1420
- Miyazawa, J., Mitoro, A., Kawashiri, S., Chada, K. K., Imai, K. (2004): Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer research*, 64, 2024-2029
- Moreira-Tabaka, H., Peluso, J., Vonesch, J. L., Hentsch, D., Kessler, P., Reimund, J. M., Dumont, S., Muller, C. D. (2012): Unlike for human monocytes after LPS activation, release of TNF-alpha by THP-1 cells is produced by a TACE catalytically different from constitutive TACE. *PloS one*, 7, e34184
- Muppidi, J. R., Tschopp, J., Siegel, R. M. (2004): Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity*, 21, 461-465

- Nakayama, S., Yokote, T., Tsuji, M., Akioka, T., Miyoshi, T., Hirata, Y., Hiraoka, N., Iwaki, K., Takayama, A., Nishiwaki, U., Masuda, Y., Nishimura, Y., Hanafusa, T. (2014): TNF-alpha Receptor 1 Expression Predicts Poor Prognosis of Diffuse Large B-cell Lymphoma, Not Otherwise Specified. *The American journal of surgical pathology*, 38, 1138-1146
- Oda, Y., Aishima, S., Morimatsu, K., Shindo, K., Fujino, M., Mizuuchi, Y., Hattori, M., Miyazaki, T., Tanaka, M., Oda, Y. (2014): Pancreatic intraepithelial neoplasia in the background of invasive ductal carcinoma of the pancreas as a prognostic factor. *Histopathology*,
- Oikonomou E, Kosmidou V, Katseli A, Kothonidis K, Mourtzoukou D, Kontogeorgos G, et al. TRAIL receptor upregulation and the implication of KRAS/BRAF mutations in human colon cancer tumors. *Int J Cancer* 2009, 125: 2127-2135.
- Old, L. J. (1988): Tumor necrosis factor. *Scientific American*, 258, 59-60, 69-75
- Ozawa, F., Friess, H., Kleeff, J., Xu, Z. W., Zimmermann, A., Sheikh, M. S., Buchler, M. W. (2001): Effects and expression of TRAIL and its apoptosis-promoting receptors in human pancreatic cancer. *Cancer Lett*, 163, 71-81
- Pallante P, Sepe R, Puca F, Fusco A. High Mobility Group A Proteins as Tumor Markers. *Frontiers in Medicine*. 2015;2:15. doi:10.3389/fmed.2015.00015.
- Peter, M. E., Budd, R. C., Desbarats, J., Hedrick, S. M., Hueber, A. O., Newell, M. K., Owen, L. B., Pope, R. M., Tschopp, J., Wajant, H., Wallach, D., Wlirout, R. H., Zornig, M., Lynch, D. H. (2007): The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*, 129, 447-450
- Peter, M. E., Krammer, P. H. (2003): The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation*, 10, 26-35
- Peter, M. E., Legembre, P., Barnhart, B. C. (2005): Does CD95 have tumor promoting activities? *Biochimica et biophysica acta*, 1755, 25-36
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A., Ashkenazi, A. (1996): Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *The Journal of biological chemistry*, 271, 12687-12690
- Prasad, N. B., Somervell, H., Tufano, R. P., Dackiw, A. P., Marohn, M. R., Califano, J. A., Wang, Y., Westra, W. H., Clark, D. P., Umbricht, C. B., Libutti, S. K., Zeiger, M. A. (2008): Identification of genes differentially expressed in benign versus malignant thyroid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14, 3327-3337
- Prasad, S., Ravindran, J., Aggarwal, B. B. (2010): NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Molecular and cellular biochemistry*, 336, 25-37
- Qian, Z. R., Asa, S. L., Siomi, H., Siomi, M. C., Yoshimoto, K., Yamada, S., Wang, E. L., Rahman, M. M., Inoue, H., Itakura, M., Kudo, E., Sano, T. (2009): Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod Pathol*, 22, 431-441

- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., Matrisian, L. M. (2014): Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer research*, 74, 2913-2921
- Raimondi, S., Maisonneuve, P., Lowenfels, A. B. (2009): Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 6, 699-708
- Rathmell, J. C., Thompson, C. B. (1999): The central effectors of cell death in the immune system. *Annual review of immunology*, 17, 781-828
- Ravi, R., Bedi, G. C., Engstrom, L. W., Zeng, Q., Mookerjee, B., Gelinas, C., Fuchs, E. J., Bedi, A. (2001): Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-[kappa]B. *Nat Cell Biol*, 3, 409-416
- Roder, C., Trauzold, A., Kalthoff, H. (2011): Impact of death receptor signaling on the malignancy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *European journal of cell biology*, 90, 450-455
- Sanlioglu, A. D., Dirice, E., Elpek, O., Korcum, A. F., Balci, M. K., Omer, A., Griffith, T. S., Sanlioglu, S. (2008): High levels of endogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression correlate with increased cell death in human pancreas. *Pancreas*, 36, 385-393
- Sanlioglu, A. D., Dirice, E., Elpek, O., Korcum, A. F., Ozdogan, M., Suleymanlar, I., Balci, M. K., Griffith, T. S., Sanlioglu, S. (2009): High TRAIL death receptor 4 and decoy receptor 2 expression correlates with significant cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Pancreas*, 38, 154-160
- Schmiegel, W., Roeder, C., Schmielau, J., Rodeck, U., Kalthoff, H. (1993): Tumor necrosis factor alpha induces the expression of transforming growth factor alpha and the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 863-867
- Schott, M., Kloppel, G., Raffel, A., Saleh, A., Knoefel, W. T., Scherbaum, W. A. (2011): Neuroendocrine neoplasms of the gastrointestinal tract. *Deutsches Arzteblatt international*, 108, 305-312
- Sejima, T., Morizane, S., Hinata, N., Yao, A., Isoyama, T., Saito, M., Takenaka, A. (2012): Fas expression in renal cell carcinoma accurately predicts patient survival after radical nephrectomy. *Urologia internationalis*, 88, 263-270
- Sethi, G., Sung, B., Aggarwal, B. B. (2008): TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 5094-5107
- Spierings, D. C., de Vries, E. G., Vellenga, E., van den Heuvel, F. A., Koornstra, J. J., Wesseling, J., Hollema, H., de Jong, S. (2004): Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 52, 821-831
- Stadel, D., Mohr, A., Ref, C., MacFarlane, M., Zhou, S., Humphreys, R., Bachem, M., Cohen, G., Moller, P., Zwacka, R. M., Debatin, K. M., Fulda, S. (2010): TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and

profoundly enhanced by XIAP inhibitors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16, 5734-5749

•Stoelcker, B., Ruhland, B., Hehlhans, T., Bluethmann, H., Luther, T., Mannel, D. N. (2000): Tumor necrosis factor induces tumor necrosis via tumor necrosis factor receptor type 1-expressing endothelial cells of the tumor vasculature. *The American journal of pathology*, 156, 1171-1176

•Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W., Sakai, A., Sueoka, E., Fujiki, H. (1999): Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. *Cancer research*, 59, 4516-4518

•Swann, J. B., Smyth, M. J. (2007): Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*, 117, 1137-1146

•Takikita, M., Hu, N., Shou, J. Z., Wang, Q. H., Giffen, C., Taylor, P. R., Hewitt, S. M. (2009): Biomarkers of apoptosis and survival in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC cancer*, 9, 310

•Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V. (1992): Two TNF receptors. *Immunology today*, 13, 151-153

•Tecchio, C., Huber, V., Scapini, P., Calzetti, F., Margotto, D., Todeschini, G., Pilla, L., Martinelli, G., Pizzolo, G., Rivoltini, L., Cassatella, M. A. (2004): IFNalpha-stimulated neutrophils and monocytes release a soluble form of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo-2 ligand) displaying apoptotic activity on leukemic cells. *Blood*, 103, 3837-3844

•Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., Krammer, P. H. (1989): Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 245, 301-305

•Trauzold, A., Siegmund, D., Schniewind, B., Sipos, B., Egberts, J., Zorenkov, D., Emme, D., Roder, C., Kalthoff, H., Wajant, H. (2006): TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 25, 7434-7439

•Trauzold, A., Wermann, H., Arlt, A., Schutze, S., Schafer, H., Oestern, S., Roder, C., Ungefroren, H., Lampe, E., Heinrich, M., Walczak, H., Kalthoff, H. (2001): CD95 and TRAIL receptor-mediated activation of protein kinase C and NF-kappaB contributes to apoptosis resistance in ductal pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncogene*, 20, 4258-4269

•Truneh, A., Sharma, S., Silverman, C., Khandekar, S., Reddy, M. P., Deen, K. C., McLaughlin, M. M., Srinivasula, S. M., Livi, G. P., Marshall, L. A., Alnemri, E. S., Williams, W. V., Doyle, M. L. (2000): Temperature-sensitive differential affinity of TRAIL for its receptors. DR5 is the highest affinity receptor. *The Journal of biological chemistry*, 275, 23319-23325

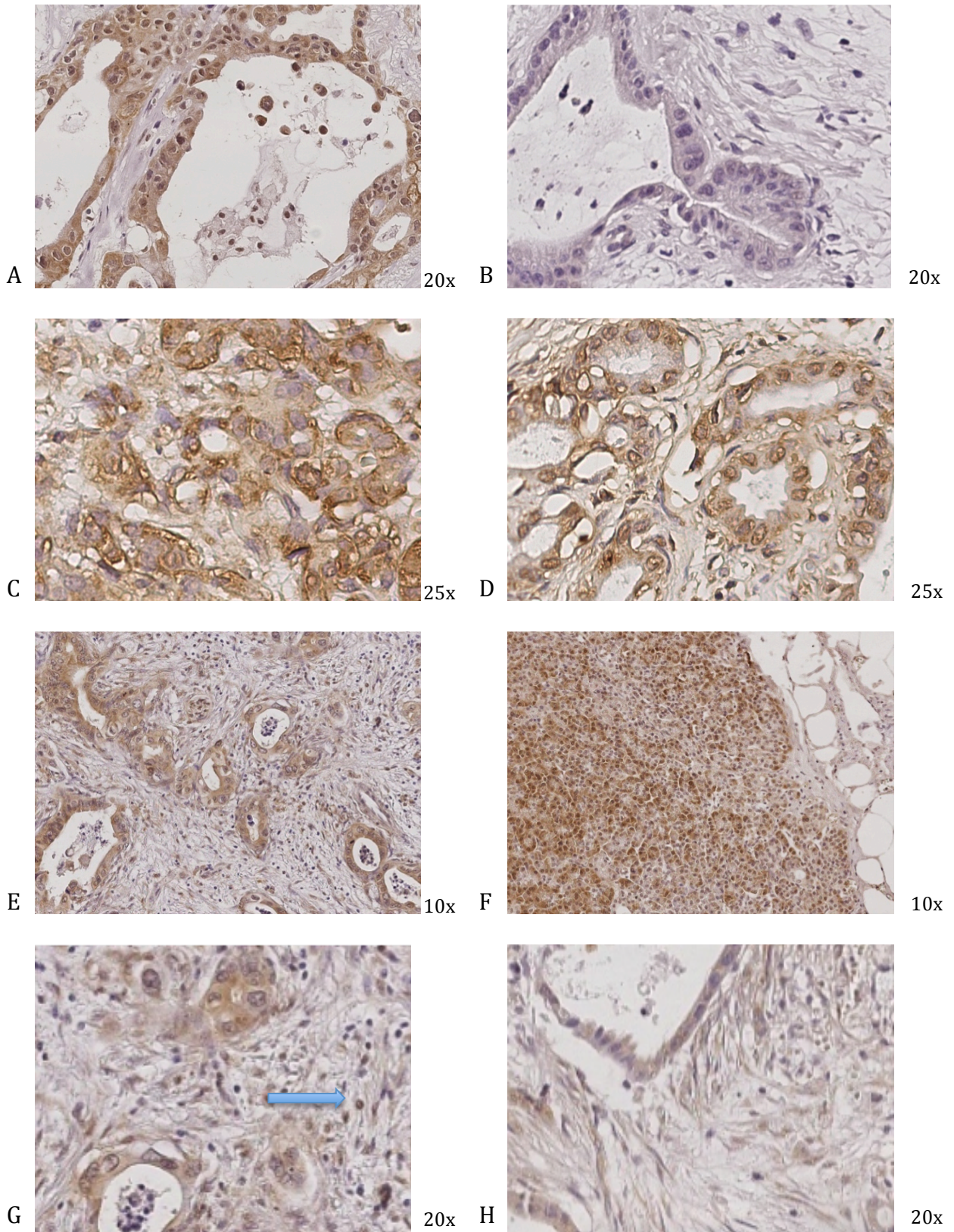
•Ungefroren, H., Kruse, M. L., Trauzold, A., Roeschmann, S., Roeder, C., Arlt, A., Henne-Bruns, D., Kalthoff, H. (2001): FAP-1 in pancreatic cancer cells: functional and mechanistic studies on its inhibitory role in CD95-mediated apoptosis. *Journal of cell science*, 114, 2735-2746

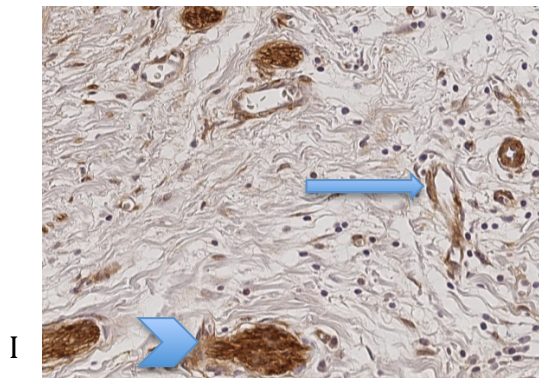
- Ungefroren, H., Voss, M., Jansen, M., Roeder, C., Henne-Bruns, D., Kremer, B., Kalthoff, H. (1998): Human pancreatic adenocarcinomas express Fas and Fas ligand yet are resistant to Fas-mediated apoptosis. *Cancer research*, 58, 1741-1749
- van Horssen, R., Ten Hagen, T. L., Eggermont, A. M. (2006): TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist*, 11, 397-408
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., Fiers, W. (1995): Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends in cell biology*, 5, 392-399
- Vassalli, P. (1992): The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual review of immunology*, 10, 411-452
- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., Goggins, M (2011). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 378, 607-620
- Waage, A., Halstensen, A., Espevik, T. (1987): Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet*, 1, 355-357
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. (2003): Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 53-66
- Walczak, H., Krammer, P. H. (2000): The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Experimental cell research*, 256, 58-66
- Walczak, H., Miller, R. E., Ariail, K., Gliniak, B., Griffith, T. S., Kubin, M., Chin, W., Jones, J., Woodward, A., Le, T., Smith, C., Smolak, P., Goodwin, R. G., Rauch, C. T., Schuh, J. C., Lynch, D. H. (1999): Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature medicine*, 5, 157-163
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Baldwin, A. S., Jr. (1996): TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science (New York, N.Y.)*, 274, 784-787
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., Baldwin, A. S., Jr. (1998): NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science (New York, N.Y.)*, 281, 1680-1683
- Wang, L., Yang, J. K., Kabaleeswaran, V., Rice, A. J., Cruz, A. C., Park, A. Y., Yin, Q., Damko, E., Jang, S. B., Raunser, S., Robinson, C. V., Siegel, R. M., Walz, T., Wu, H. (2010): The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nature structural & molecular biology*, 17, 1324-1329
- Wang, X. (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & development*, 15, 2922-2933
- Watanabe, N., Tsuji, N., Tsuji, Y., Sasaki, H., Okamoto, T., Akiyama, S., Kobayashi, D., Sato, T., Yamauchi, N., Niitsu, Y. (1996): Endogenous tumor necrosis factor inhibits the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor and adriamycin in pancreatic carcinoma cells. *Pancreas*, 13, 395-400
- Waters, J. P., Pober, J. S., Bradley, J. R. (2013): Tumour necrosis factor and cancer. *The Journal of pathology*, 230, 241-248

- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., et al. (1995): Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3, 673-682
- Winterhoff, B. J., Arlt, A., Duttman, A., Ungefroren, H., Schafer, H., Kalthoff, H., Kruse, M. L. (2012): Characterisation of FAP-1 expression and CD95 mediated apoptosis in the A818-6 pancreatic adenocarcinoma differentiation system. *Differentiation; research in biological diversity*, 83, 148-157
- Wolpin, B. M., Chan, A. T., Hartge, P., Chanock, S. J., Kraft, P., Hunter, D. J., Giovannucci, E. L., Fuchs, C. S. (2009): ABO blood group and the risk of pancreatic cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101, 424-431
- Wullaert, A., Heyninck, K., Beyaert, R. (2006): Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF- κ B and JNK activation in hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 72, 1090-1101
- Yoshimura, H., Dhar, D. K., Nakamoto, T., Kotoh, T., Takano, M., Soma, G., Nagasue, N. (2003): Prognostic significance of tumor necrosis factor receptor in colorectal adenocarcinoma. *Anticancer research*, 23, 85-89
- Young, A. R., Narita, M. (2007): Oncogenic HMGA2: short or small? *Genes & development*, 21, 1005-1009
- Zhang, X. D., Franco, A., Myers, K., Gray, C., Nguyen, T., Hersey, P. (1999): Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma. *Cancer research*, 59, 2747-2753

7 Anhang

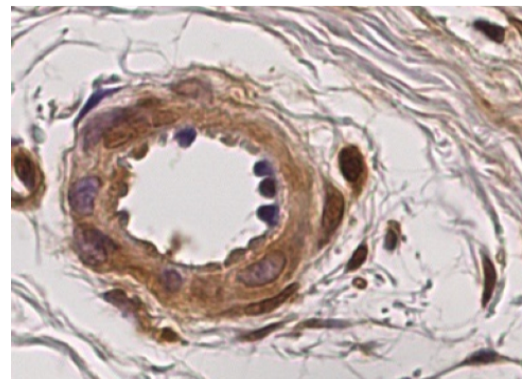
Repräsentative Beispiele immunhistochemischer Färbungen





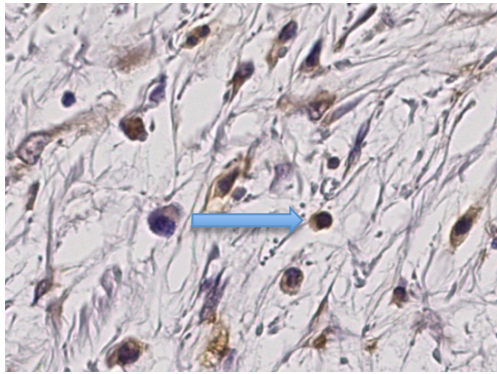
I

10x



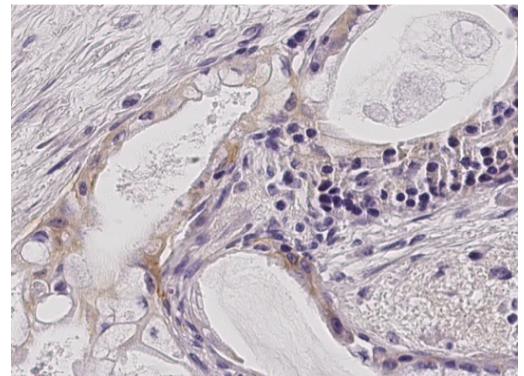
J

40x



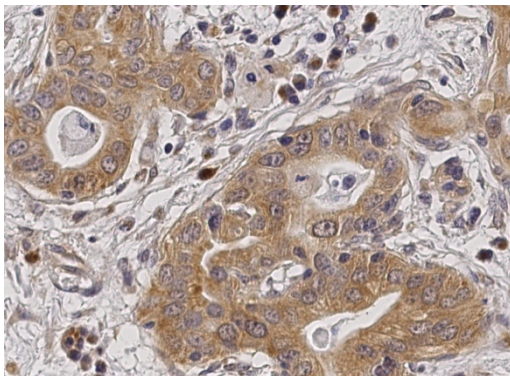
K

25x



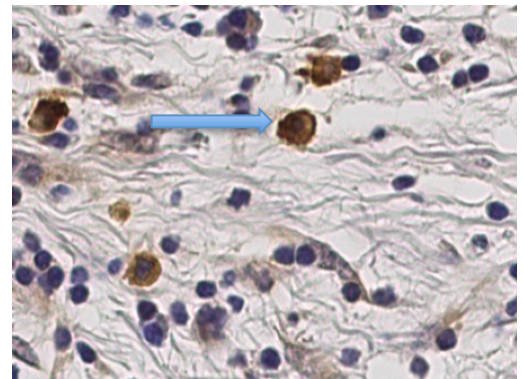
L

20x



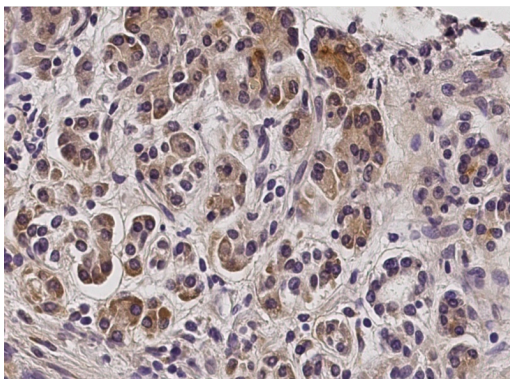
M

20x



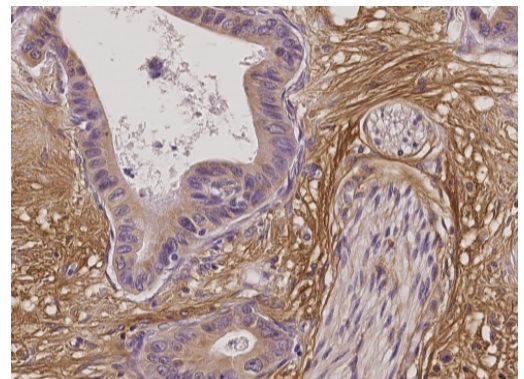
N

40x



O

20x



P

10x

Legende Anhang 7: Repräsentative Beispiele immunhistochemischer Färbungen

(A) TRAIL-R1: starke cytoplasmatische und partielle nukleäre Expression; (B) TRAIL-R1: keine/schwache Expression, keine Immunoreaktivität in den Stromazellen; (C) TRAIL-R2: starke zytoplasmatische Expression; (D) TRAIL-R2: nukleäre Expression, insbesondere an der Zellmembran; (E) TRAIL-R4: starke zytoplasmatische Expression; (F) TRAIL-R4: Immunoreaktivität in Azinuszellen des Pankreas; (G) TRAIL-R4: Immunoreaktivität in Lymphozyten (s. Pfeil); (H) TRAIL: Schwache Expression; (I) TRAIL: starke Expression in neuronalen Zellen (s. kurzer Pfeil) und Endothelzellen (s. langer Pfeil) (von Karstedt *et al.*, 2015); (J) CD95: starke zytoplasmatische Expression mit sporadischer nukleärer Immunoreaktivität; (K) CD95: Expression in Granulozyten (Pfeil); (L) TNF-R1: schwache zytoplasmatische Expression; (M) TNF-R1: starke zytoplasmatische Expression; (N) TNF-R1: Expression in Granulozyten (Pfeil); (O) TNF-R1: Immunoreaktivität in Azinuszellen des Pankreas, zytoplasmatische Expression in PDAC; (P) TNF α : zytoplasmatische Expression, insbesondere an der luminalen Seite; keine nukleäre Immunoreaktivität; starke Expression in Stromazellen

Etablierung des TRAIL-Rezeptor 3-Färbeprotokolls

Färbung an zufällig ausgewählten Pankreaskarzinomschnitten mittels Polymer und DAB als Chromogen angelehnt an das von Ganten et al. verwendete Protokoll (Ganten et al. 2009) (Polymer-Färbung meist kräftiger als Biotin-System):

Datum	Objekt	Puffer	Verdünnung	Auswertung
23.2.2012	14338/99	Citrat	1:200	negativ

Testung an weiteren Pankreaskarzinomfällen, unterschiedliche Verdünnungen und Vorbehandlungen:

Datum	Objekt	Puffer	Verdünnung	Auswertung
27.2.2012	22664-01	Citrat	1:100	negativ
27.2.2012	22664-01	Citrat	1:200	negativ
27.2.2012	22664-01	Ohne Citrat (Puffern mit TBS statt der	1:100	negativ

		Schnellkochtopfphase)		
27.2.2012	22664-01	TRIS-HCl pH= 10,0	1:100	negativ

Ab jetzt Verzicht auf Tween in der Pufferlösung, dadurch wird eine Signalverstärkung erwartet:

Datum	Objekt	Puffer	Verdünnung	Auswertung
28.2.2012	7383/03	TRIS-HCl	1:50	negativ

Verwendung von Pankreaskarzinom-TMAs um Individuenspektrum zu erweitern:

Datum	Objekt	Puffer	Verdünnung	Auswertung
29.2.2012	TMA	TRIS-HCl	1:25	negativ
29.2.2012	TMA	TRIS-HCl	1:50	negativ

Modifikation der Erhitzungsphase: längere Verweildauer der Objektträger bei hoher Temperatur im Schnellkochtopf: Erhitzen bis auf 99° Celsius, dann Ausschalten der Kochplatte, Belassen der Schnitte in der Küvette für 10 Minuten im geschlossenen Schnellkochtopf, anschließend wiederum Erhitzung auf 99° Celsius, Belassen der Schnitte in der Küvette für 5 Minuten im geschlossenen Schnellkochtopf, dann schonendes Abkühlen.

Verzicht auf die 30 Minute Inkubationszeit bei Raumtemperatur nach Auftragen des Primärantikörpers, stattdessen direkt Lagerung bei 4° Celsius über Nacht.

Datum	Objekt	Puffer	Verdünnung	Auswertung
06.3.2012	TMA	Citrat	1:50	negativ

Starke Erhöhung der Antikörperkonzentration in der Primär-Antikörperlösung:

Datum	Objekt	Puffer	Verdünnung	Auswertung
07.03.2012	TMA	Citrat	1:10	Erstmals positives Signal, vereinzelt braune Zellen

				sichtbar
07.03.2012	TMA	EDTA	1:10	Erstmals positives Signal, vereinzelt braune Zellen sichtbar, etwas Hintergrund

Ein schwaches Ergebnis der immunhistochemischen Färbung mit dem TRAIL 3-Rezeptorantikörper bei einer Verdünnung von 1:10.

4.10.2012: Bestellung eines neuen TRAIL-R3-Antikörper. Der alte TRAIL-R3-Antikörper war schon bei Färbungen an Mamma- und PankreasCa in einer Vorgängerarbeit (Franka Annewanter) negativ. Nun parallele Färbung mit beiden Antikörpern um festzustellen, ob der bisher verwendete Antikörper beschädigt ist und zur Testung des neuen kommerziellen Antikörpers.

Neu erworbener Antikörper:

Datum	Objekt	Puffer	Verdünnung	Auswertung
31.10.12	15500/03	Citrat, lang	1:10	Sehr schwach positiv
31.10.12	15500/03	Citrat, lang	1:50	negativ
31.10.12	15500/03	Citrat, lang	1:100	negativ
31.10.12	10453/02	Citrat, lang	1:50	negativ

Bisher verwendeter Antikörper:

Datum	Objekt	Puffer	Verdünnung	Auswertung
31.10.12	15500/03	Citrat, lang	1:10	Sehr schwach positiv

Wiederholung des Färbeprotokolls mit TRAIL-R3 an MammaCa-Fällen, da der Antikörper an MammaCa-Gewebe gut und positiv etabliert worden ist. Evtl kein Vorkommen von TRAIL-R3 in Pankreasgewebe. In dem Fall wäre an den folgenden Fällen ein stärkeres Farbergebnis zu erwarten.

Datum	Objekt	Puffer	Verdünnung	Auswertung
2.11.12	8723/12 MammaCa	Citrat, lang	1:10	negativ
2.11.12	8552/12 MammaCa	Citrat, lang	1:10	negativ

2.11.12	9951/12 MammaCa	Citrat, lang	1:10	negativ
2.11.12	9951/12 MammaCa	Citrat, lang	NK	negativ
2.11.12	Pankreas TMA	Citrat, lang	1:10	Eine Stanze schwach positiv

Beendigung der Etablierungsversuche mit dem TRAIL-R3-Antikörper.

Korrelation der erhobenen Parameter mit den Positivraten tumorbefallener Lymphknoten

	TRAILR1	TRAILR2	TRAILR4	HMGA2	TRAIL-Ligand	CD95R	TNFR1	TNFL
Intensität Zytoplasma								
τ	-,126	-,054	,102	,045	,053	,090	-,146	,039
p-Wert	,436	,748	,538	,783	,746	,588	,366	,820
N	33	32	33	34	33	34	34	32
Anzahl pos Zellen Zytoplasma								
τ	-,256	,014	,200	,000	-,225	,189	-,206	,017
p-Wert	,124	,937	,215	1,000	,175	,273	,199	,921
N	33	32	33	34	33	34	34	32
Score Zytoplasma								
τ	-,115	-,023	,082	,000	-,092	,146	-,155	,013
p-Wert	,497	,896	,627	1,000	,589	,402	,356	,939
N	33	32	33	34	33	34	34	32
Intensität Kern								
τ	-,191	-,055	,132	,230	,014	-,140	,182	.
p-Wert	,237	,740	,456	,178	,933	,395	,287	.
N	33	32	33	34	33	34	34	32
Anzahl pos Kerne								
τ	-,190	-,112	,132	,228	,024	-,244	,186	.
p-Wert	,236	,491	,456	,178	,888	,130	,285	.
N	33	32	33	34	33	34	34	32
Score Kern								
τ	-,158	-,068	,132	,230	,043	-,251	,184	.
p-Wert	,336	,686	,456	,178	,800	,119	,286	.
N	33	32	33	34	33	34	34	32
Gesamtscore								
τ	-,200	-,055	,097	,023	-,059	-,174	-,067	,013
p-Wert	,206	,739	,565	,890	,712	,265	,681	,939
N	33	32	33	34	33	34	34	32

Tab. 10: Korrelation der erhobenen Parameter mit den dichotomisierten Lymphknotendaten mittels Korrelationskoeffizient Kendall-Tau. Angegeben sind der p-Wert und die Anzahl der untersuchten Fälle N.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Holger Kalthoff für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung danken. Er stand mir jederzeit für konstruktive Gespräche zur Verfügung, sorgte mit seinen kritischen Anregungen für die Fortschritte in der Arbeit und vermittelte das nötige Fachwissen.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Frau Sandra Krüger, Medizinisch-Technische Assistentin im Institut für Pathologie, UKSH Campus Kiel, für die hervorragende Betreuung des praktischen Teils meiner Arbeit. Ihre kompetenten Ratschläge waren für das Gelingen der immunhistochemischen Experimente unverzichtbar.

Herrn Prof. Dr. Christoph Röcken, Leiter des Institutes für Pathologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, gilt ein Dank für die Bereitstellung der Materialien und des Arbeitsplatzes, sowie seine wertvollen Ratschläge bei schwierigen Fragestellungen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. rer. nat. Christian Röder für die Bereitstellung der Patientendaten und die wissenschaftliche Unterstützung.

Zudem möchte ich meinen Eltern und meiner Familie danken, die mich stets auf meinem Lebensweg begleiten. Ihr Interesse und ihre Ermunterung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit selbständig von mir verfasst wurde und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel Verwendung fanden. Diese Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Auszügen an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Ort, Datum

(Friederike Gärtner)

Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL



ETHIK-KOMMISSION

An
Herrn Prof. Dr. B. Kremer
Direktor der Klinik für
Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
Arnold- Heller- Str. 7

Universitäts-Kinderklinik
Schwanenweg 20
24105 Kiel
Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

28.4.1999

24105 Kiel

Nachrichtlich: 1.) Herrn Prof. Dr. G. Klöppel, Institut für Allgemeine Pathologie und
Pathologische Anatomie der CAU zu Kiel, Michaelisstr. 11, 24105 Kiel
2.) Herrn Prof. Dr. H. Kalthoff, Klinik für Allgemeine Chirurgie und
Thoraxchirurgie der CAU zu Kiel, Arnold- Heller- Str. 7, 24105 Kiel

AZ: A 110/99

Studienplan: **Forschungs- und Zusammenarbeitsvertrag vom 15.12.1998**
Forschungsprojekt : „ Aufbau einer Krebsgewebe-
sammlung “

Antragsteller: Prof. Dr. Kremer, Prof. Dr. Kalthoff, Prof. Dr. Klöppel

Datum des

Antrages: 16.2.1999

Datum des

überarb. Antrages: 23.4.1999

Bestätigung

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem oben bezeichneten Versuchsplan eingereichten Unterlagen auf mögliche berufsethische und berufsrechtliche Bedenken hin überprüft.

Die Kommission stimmt darin überein, daß gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine Bedenken bestehen.

Es wird darauf hingewiesen, daß künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

J. Schaub

Prof. Dr. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

